



CLAUDIA KÜNEWEG

**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER ZELLPHYSIOLOGISCHE  
EFFEKTE EINER SELEKTION AUF STAUBBADE-  
AKTIVITÄT BEI DER JAPANISCHEN WACHTEL  
(*Coturnix japonica*)**

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Untersuchungen über zellphysiologische Effekte  
einer Selektion auf Staubbadeaktivität  
bei der Japanischen Wachtel (*Coturnix japonica*)**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Claudia Küneweg**

Tierärztin aus Marburg/ Lahn

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. V. Dzapo  
Prof. Dr. H. Würbel

Tag der Disputation: 28.03.2006

Für meine Eltern



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	IV
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	3
2.1	Die japanische Wachtel ( <i>Coturnix japonica</i> )	3
2.2	Der Vogelembryo und sein Stoffwechsel	4
2.2.1	Der Aufbau des Vogeleis	4
2.2.2	Gemeinsamkeiten der Embryonalentwicklung im Vogelei	5
2.2.3	Die Entwicklung des Vogelembryos	7
2.2.3.1	Die Keimblattbildung vor der Eiablage	7
2.2.3.2	Die Keimblattbildung nach der Eiablage	7
2.2.3.3	Embryonalhüllen und Versorgungskreisläufe	8
2.2.4	Physikalische Grundlagen des embryonalen Gasaustauschs	10
2.2.5	Der Übergang zur Lungenatmung	11
2.2.6	Untersuchungen zur embryonalen Atmung	13
2.3	Mitochondrien	17
2.3.1	Aufbau der Mitochondrien	17
2.3.2	Aufgaben der Mitochondrien	18
2.3.3	Herkunft und Vermehrung der Mitochondrien	18
2.3.4	Prinzip und Ablauf der oxidativen Phosphorylierung	19
2.3.5	Der Weg der Elektronen	21
2.3.6	Die Synthese und Ausschleusung von ATP	23
2.3.7	Bilanz der oxidativen Phosphorylierung und ADP/O-Quotient	23
2.3.8	Stadien der mitochondrialen Atmung und Atmungskontrolle	24
2.3.9	Störungen und Bedeutung der Mitochondrien	25
2.3.10	Versuche zum mitochondrialen Stoffwechsel	27
2.4	Die Natrium-Kalium-ATPase	31
2.4.1	Struktur und Funktion der Natrium-Kalium-ATPase	31
2.4.2	Einflussfaktoren auf die Natrium-Kalium-ATPase	33
2.4.3	Die Bedeutung der Natrium-Kalium-ATPase in der Neurologie	33
2.5	Selektion, Verhalten und Stoffwechselphysiologie bei Nutzgeflügel	35
2.5.1	Gründe und Voraussetzungen für eine Selektion auf Verhaltensmerkmale	35

2.5.2	Selektionsexperimente an japanischen Wachteln	36
2.5.2.1	Selektion auf lange bzw. kurze tonische Immobilität	36
2.5.2.2	Selektion auf hohe bzw. niedrige soziale Motivation	38
2.5.2.3	Selektion auf hohe bzw. niedrige Stresshormonspiegel	39
2.5.2.4	Selektion auf hohe bzw. niedrige Staubbadeaktivität	39
2.5.3	Korrelierte Auswirkungen der Selektion auf die Tiere	42
2.5.3.1	Auswirkungen der Selektion auf die Furchtsamkeit	42
2.5.3.2	Auswirkungen der Selektion auf das Sozialverhalten	43
2.5.3.3	Auswirkungen der Selektion auf Leistung, Biochemie und Genetik	44
2.5.4	Sonstige Untersuchungen	45
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>46</b>
3.1	Material	46
3.1.1	Chemikalien und Enzyme	46
3.1.2	Puffer und Lösungen	46
3.1.3	Geräte	47
3.1.4	Untersuchte Tiere und ihre Haltung	48
3.2	Methoden	49
3.2.1	Kunstbrut und Messung der embryonalen Atmungsaktivität	49
3.2.2	Gewinnung der Proben	51
3.2.3	Bestimmung der mitochondrialen Atmungsaktivität	52
3.2.4	Bestimmung der Aktivität der ATPasen im Gehirn	55
3.3	Statistische Auswertung:	57
<b>4</b>	<b>Untersuchungsergebnisse</b>	<b>59</b>
4.1	Überlebensrate und Schlupffähigkeit	59
4.1.1	Brutergebnis unter Berücksichtigung der Linien und des Durchgangs	59
4.2	Embryonaler Sauerstoffverbrauch	60
4.2.1	Verlauf des embryonalen Sauerstoffverbrauchs	60
4.2.2	Embryonaler Sauerstoffverbrauch am 7. Brutttag	62
4.2.2.1	Linienunterschiede in der Atmungsaktivität am 7. Brutttag	63
4.2.2.2	Unterschiede in der Atmungsaktivität am 7. Brutttag zwischen unterschiedlich vitalen Embryonen und zwischen den Brutdurchgängen	64
4.2.3	Embryonaler Sauerstoffverbrauch am 12. Brutttag	65
4.2.3.1	Linienunterschiede in der Atmungsaktivität am 12. Brutttag	65



4.2.3.2	Unterschiede in der Atmungsaktivität am 12. Brutttag zwischen unterschiedlich vitalen Embryonen und zwischen den Brutdurchgängen	66
4.2.3.3	Einflussfaktoren auf die Varianz in der embryonalen Atmungsaktivität am 7. und am 12. Brutttag	66
4.3	Mitochondriale Atmungsaktivität	70
4.3.1	Proteingehalt der Mitochondriensuspension von Leber bzw. Pectoralismuskel	70
4.3.2	Atmungsaktivität der Lebermitochondrien	70
4.3.2.1	Linienunterschiede in der Atmungsrate des Status 3 der Lebermitochondrien	71
4.3.3	Atmungsaktivität der Pectoralismi­to­chondrien	72
4.3.3.1	Linienunterschiede in der Atmungsrate im Status 3 der Pectoralismi­to­chondrien	73
4.3.4	Einflussfaktoren auf die mitochondriale Atmungsaktivität von Leber- und Brustmuskel	74
4.3.5	Der Atmungskontrollindex RCR	76
4.3.6	Effektivität der mitochondrialen Atmung: Der ADP/O-Quotient	77
4.4	Korrelationen zwischen embryonalen und mitochondrialen Atmungsparametern	78
4.5	Aktivitäten der ATPasen im Gehirn	82
4.5.1	ATPase-Aktivität im Gehirn: Mittelwertvergleich der Linien N, K und H	82
4.5.2	Korrelationen zwischen den ATPase-Aktivitäten im Gehirn und anderen Messergebnissen	83
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>114</b>

NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NaNO <sub>3</sub>	Natriumnitrat
nm	Nanometer
nM	Nanomol
n.s.	nicht signifikant
O	atomarer Sauerstoff
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PK	Pyruvatkinase
RCR	Atmungskontrollindex (respiratory control ratio)
Tab.	Tabelle
TI	Tonische Immobilität
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propandiol
%	Prozent
*	signifikant ( $P \leq 0,05$ )
**	hochsignifikant ( $P \leq 0,01$ )
***	höchstsignifikant ( $P \leq 0,001$ )
/	oder
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

**Verzeichnis der Abkürzungen:**

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
et al.	und weitere
EU	Europäische Union
g	relative Zentrifugalbeschleunigung ( $9,81\text{m/s}^2$ )
gr	Gramm
h	Stunde
H	Linie mit hoher Staubbadeaktivität
HCl	Salzsäure
HS	Linie high stress
HSR	Linie mit hoher sozialer Motivation (high social reinstatement)
K <sup>+</sup>	Kalium-Kation
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
LDH	Laktatdehydrogenase
M.	Muskulus
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
N	Linie mit niedriger Staubbadeaktivität
Na <sup>+</sup>	Natrium-Kation
NaCl	Natriumchlorid



## 1 Einleitung

Die fortschreitende Rationalisierung der Landwirtschaft in den Industrieländern und die Nachfrage nach immer billigeren Lebensmitteln haben in den vergangenen Jahrzehnten zu einer starken Intensivierung der Nutztierhaltung geführt.

Auf dem Geflügelsektor ist die konkurrenzfähige Produktion von Eiern und Fleisch in konventioneller Haltung nur noch mit hohen Tierzahlen und stark automatisierten Haltungssystemen möglich. Die alleinige Selektion auf Produktivität in der Geflügelzucht hat stark spezialisierte Linien hervorgebracht, bei denen jedoch teilweise Verhaltensprobleme wie Federpicken und Kannibalismus aufgetaucht sind.

Weiterhin kann in bestimmten Haltungssystemen das arttypische Verhalten nur eingeschränkt oder gar nicht ausgeübt werden. Hierdurch kann es zu Frustration, Leerlaufhandlungen, Stereotypen und weiteren Verhaltensstörungen bei den betroffenen Tieren kommen, die Ausdruck einer tierschutzrelevanten Belastung sind.

Es ist mittlerweile erwiesen, dass viele Verhaltensmerkmale eine erbliche Komponente haben und sich durch künstliche Zuchtauswahl in die gewünschte Richtung beeinflussen lassen. So können die Stressanfälligkeit oder die Neigung zu Aggressionen gegen Artgenossen verringert werden. Bei den heutigen Legehybriden wurde die Brütigkeit durch Selektion nahezu eliminiert.

Das Staubbaden ist bei Hühnervögeln eine essentielle und demzufolge hauptsächlich endogen gesteuerte Verhaltensweise, deren Motivation fast unabhängig von äußeren Faktoren ist. Werden die Tiere eine Zeitlang an der Ausübung dieses Verhaltens gehindert, tritt es anschließend verstärkt auf, was man als *rebound*-Effekt bezeichnet. Kann das Verhalten gar nicht ausgeführt werden, kommt es zu Frustration, Leerlaufhandlungen und möglicherweise weiteren Verhaltensstörungen, die als Zeichen für eine Leidenssituation gewertet werden können. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch dieses essentielle Merkmal durch Selektion beeinflussbar ist. Aus einer Population japanischer Wachteln entstanden auf diese Weise zwei Selektionslinien mit besonders hoher bzw. niedriger Staubbadeaktivität sowie eine unselektierte Kontrolllinie.

In der vorliegenden Arbeit wurden Tiere dieser drei im Hinblick auf ihre Staubbadeaktivität genetisch differenten Linien näher untersucht. An den Bruteiern wurden Messungen des embryonalen Sauerstoffverbrauchs durchgeführt. In einem Vorversuch mit täglichen Messungen wurde zunächst die Methode auf die Anwendbarkeit für Wachteleier

getestet, die günstigsten Messtage für den Hauptversuch bestimmt und eine Sauerstoffverbrauchskurve für die gesamte Embryonalentwicklung erstellt.

Im Hauptversuch fanden dann an zwei ausgewählten Bruttage Messungen zur embryonalen Atmungsaktivität statt. Die Ergebnisse wurden auf Zusammenhänge mit der Zugehörigkeit zu den unterschiedlichen Linien sowie auf die Aussagekraft über die embryonale Vitalität überprüft.

Nach der Aufzucht und Schlachtung der Tiere fanden an Proben aus Leber und Brustmuskulatur Untersuchungen zur mitochondrialen Stoffwechselaktivität statt. Hierbei kommen für beide Gewebearten die Substrate Glutamat-Malat und Succinat zum Einsatz. Abschließend wurde in Gehirnprouben von Tieren aller drei Linien die Aktivität der  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$  bestimmt.

Die Ergebnisse sämtlicher Messungen wurden auf Korrelationen mit der Linienzugehörigkeit und mit den übrigen Ergebnissen überprüft.

Die vorliegende Arbeit soll mögliche Auswirkungen der zuvor durchgeführten Selektion auf physiologische und biochemische Abläufe im Organismus beleuchten.

Welche Hinweise auf korrelierte Effekte der erfolgten Selektion in Bezug auf die Zellphysiologie der Tiere gibt es?

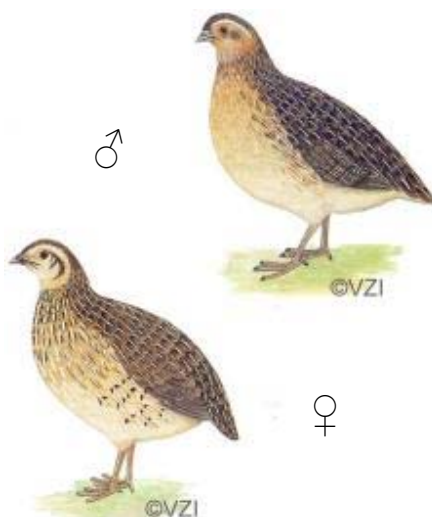
Die embryonale und die mitochondriale Atmungsaktivität sind eng mit dem Energiestoffwechsel und somit der Leistungsfähigkeit eines Organismus verknüpft. Daher wäre es denkbar, dass sich die Selektion auf hohe bzw. niedrige Staubbadeaktivität auch auf diese Bereiche ausgewirkt hat. Geht eine verminderte Staubbadeaktivität mit herabgesetzten Stoffwechselraten der untersuchten Gewebearten einher? Entstehen hier möglicherweise unerwünschte Konsequenzen für das Wohlbefinden und/oder die Leistungsfähigkeit der Tiere?

Die Funktion der  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$  ist entscheidend für den Aufbau des Membranpotentials tierischer Zellen und daher für die Reizweiterleitung an Neuronen. Sie wurde bereits mit Verhaltensänderungen und psychischen Störungen beim Menschen in Verbindung gebracht. Durch die vorliegenden Untersuchungen soll auch eine mögliche Rolle dieses Enzyms bei der Steuerung des Staubbadeverhaltens abgeklärt werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die japanische Wachtel (*Coturnix japonica*)

Die japanische Wachtel gehört zur Familie der Fasanenartigen (*Phasianidae*) in der Ordnung der Hühnervögel (*Galliformes*). Sie galt lange als Unterart der gemeinen Wachtel (*Coturnix coturnix*) in der Gattungsgruppe der Wachteln (*Coturnicini*), wird jedoch von den meisten Autoren wegen einiger grundlegender Besonderheiten mittlerweile als eigenständige Spezies *Coturnix japonica* (Abb. 2-1) angesprochen (MILLS et al., 1997). Das Schlachtgewicht von 110 gr wird bereits mit sechs Wochen erreicht; ausgewachsene japanische Wachtelhennen wiegen etwa 140 gr (ZUCKER et al., 1968; PEH, 1969) und sind etwas größer und schwerer als die Hähne. Legelinien bringen es auf 250-365 Eier im Jahr (PEH, 1969; SCHOLTYSEK et al., 1978) und zeigen keine Brütigkeit mehr (GERKEN, 1991). Die Verwandtschaft der Wachteln mit Haushühnern, Truthühnern und Fasanen prädestiniert sie für die Verwendung als Modelltier in der Nutzgeflügelresearch (SCHOLTYSEK et al., 1978), selbst wenn ihre Verwendung in der vergangenen Dekade stagniert (MINVIELLE, 2004). Ihr Nahrungs- und Platzbedarf sind vergleichsweise gering, und ihre frühe Legereife mit bis zu fünf Generationen im Jahr ermöglicht schnelle Ergebnisse in Genetik- und Fortpflanzungsstudien (PEH, 1969). Das schnelle Wachstum und der hohe Energieumsatz sind vorteilhaft bei Untersuchungen zu Stoffwechselaktivität und Nährstoffbedarf (PEH, 1969; ZUCKER et al., 1968; SCHOLTYSEK et al., 1978). Zum Verhaltensrepertoire der Wachteln gehört das regelmäßige Staubbaden (GERKEN, 1983 und 1991; ZUCKER et al., 1968).



**Abb. 2-1:** *Coturnix japonica*: Hahn und Henne  
(Quelle: Verband der Ziergeflügelzüchter)

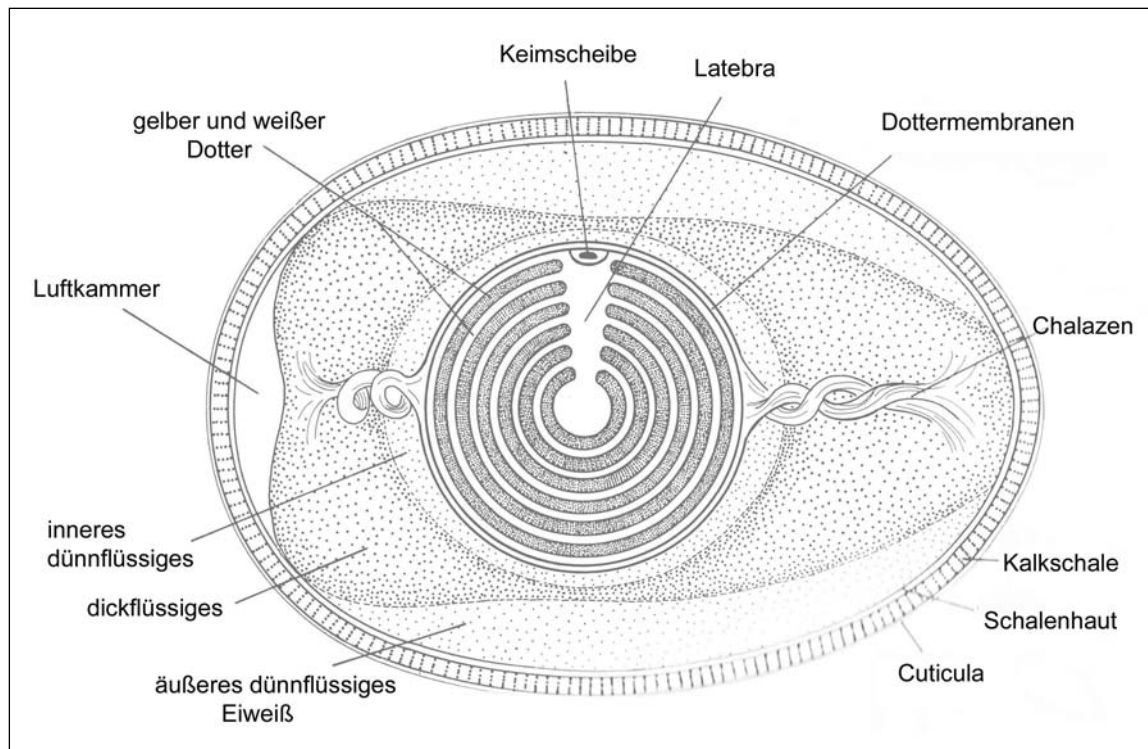
## 2.2 Der Vogelembryo und sein Stoffwechsel

### 2.2.1 Der Aufbau des Vogeleis

Die durchschnittlichen Gewichtsanteile im Vogelei betragen 55 % bis 67 % für das Eiklar, 30 bis 35 % für den Eidotter und ca. 10 % für die Eischale. Die durchschnittliche Masse beträgt für Wachteleier gut 10 gr, ihre Zusammensetzung gleicht mit ca. 58 % Eiklar, 31 % Dotter und 11 % Eischale mit Häuten in etwa der des Hühnereis (ZUCKER et al., 1967). Das Eiklar besteht zum größten Teil (ca. 87 %) aus Wasser und zu etwa 11 % aus Proteinen. Der Dotter setzt sich zusammen aus ca. 50 % Wasser; ca. 32 % Lipiden, ca. 16 % Proteinen (Low density Fraktion, Lipovitelline u.a.), ca. 1 % Kohlehydraten und ca. 1,1 % Mineralstoffen (NICKEL et al., 1992).

Das Ei (Abb. 2-2) besteht zunächst aus der befruchteten oder unbefruchteten Eizelle oder Dotterkugel, die von der vierschichtigen Dotterhaut umhüllt wird. Diese Dottermembranen werden bei der schraubigen Eileiterpassage des Eis unter Zugabe von faserigen Eiklaranteilen zu den Hagelschnüren (*Chalazen*) verdrillt, die im Eiklar enden und die Dotterkugel in einer flexiblen Schwebe halten. Am animalen Pol der Dotterkugel ruht der abgeflachte Zellkern mit dem ihn umgebenden Bildungsplasma als Keimscheibe (*Discus germinativus*) auf dem Dotterbett (*Latebra*). Die *Latebra* besteht aus weißem Dotter und ähnelt strukturell einem Pendel; es wird vermutet, dass sie im Dotter dafür sorgt, dass die Keimscheibe stets nach oben zeigt. Um die *Latebra* herum lagern sich konzentrische Schichten gelben und weißen Dotters an. Die Dotterkugel und ihre Membranen sind von drei Schichten Eiklar umgeben: Die innere und äußere Schicht sind eher dünnflüssig, die mittlere Schicht ist zähflüssig und reicht an den Polen bis an die Schalenhaut heran, wodurch Hagelschnüre und Dotter verankert werden. Auf das Eiklar folgt nach außen hin die Schalenhaut mit ihrem inneren und äußeren Blatt, zwischen denen später der Luftspalt und am stumpfen Ende des Eis die Luftkammer entstehen. Schließlich ist das Ei umgeben von der typischen Kalkschale aus Kalziumsphäriten, deren zahlreiche mikroskopisch kleiner Poren durchlässig für gasförmige Stoffe (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, Wasserdampf etc.) sind. Die äußerste Schicht des Eis ist schließlich die Wachshaut (*Cuticula*) (NICKEL et al., 1992; SCHNORR und KRESSIN, 2001).





**Abb.2-2:** Aufbau des Hühnereis (nach SCHNORR und KRESSIN, 2001)

### 2.2.2 Gemeinsamkeiten der Embryonalentwicklung im Vogelei

Es gibt über 8000 bekannte Vogelarten, die die unterschiedlichsten Verbreitungsgebiete haben und sich in Aussehen und Lebensweise teilweise stark unterscheiden. Ihnen allen gemeinsam ist die Fortpflanzung durch Eier, die von einem halben gr (Kolibri) bis hin zu gut 1500 gr (Strauß) wiegen können und zwischen elf (manche Sperlingsvögel) und 80 Tagen (Kiwis) bebrütet werden (HOYT und RAHN, 1980; RAHN und AR, 1980; VLECK et al., 1980; VLECK und VLECK, 1987). Trotz dieser großen Unterschiede funktioniert die Entwicklung des Vogelembryos im Ei bei sämtlichen Arten nach demselben Prinzip. Zum Zeitpunkt der Eiablage ist die unmittelbare hormonelle Einflussnahme der Mutter auf den Embryo abgeschlossen, und die Prozesse der Embryonalentwicklung und des Schlupfes laufen weitgehend autonom ab (FARNER et al., 1982; VLECK et al., 1980; VLECK und VLECK, 1987).

Der Energie- und Sauerstoffbedarf sowie der Wasserverlust pro Masseneinheit bis zum Schlupf bewegen sich für verschiedene Vogelspezies in der gleichen Größenordnung (RAHN und AR, 1980; TULLETT und DEEMING, 1982; VISSCHEDIJK et al., 1985; VLECK et

al., 1980; VLECK und VLECK, 1987). So beträgt beispielsweise der Wasserverlust durchschnittlich um die 15 % (AR und RAHN, 1985; TULLETT und DEEMING, 1982; VISSCHEDIJK et al., 1985; RAHN und AR, 1980) und das Gewicht des fertigen Kükens etwa 65 % der Frischeimasse (RAHN und AR, 1980). Das Ei enthält alle notwendigen Informationen, Nährstoffe und Wasser, um innerhalb einer vordefinierten Zeitspanne ein Küken hervorzubringen (AR und RAHN, 1985; FARNER et al., 1982; RAHN und AR, 1980; VLECK und VLECK, 1987). RAHN und AR (1980) betrachten die Brutzeit als einen Lebensabschnitt mit vorhersehbarem Ende, dessen Verstreichen sie mit einem vollen Umlauf der Zeiger um ein Ziffernblatt vergleichen. Bei langer Inkubationszeit rücken die Zeiger langsam, bei kurzer Inkubationszeit schnell vor; gleiche Zeigerstände entsprechen vergleichbaren Stadien der Embryonalentwicklung. Das Nährstoffbudget dieses Lebensabschnitts wird für die Biosynthese der Gewebe und den Erhaltungsbedarf des Embryos nach und nach verbraucht bzw. umgewandelt (VLECK und VLECK, 1987). Am Ende der Brutzeit steht ein Küken mit Dottersack, dessen O<sub>2</sub>-Bedarf und CO<sub>2</sub>-Produktion unmittelbar vor dem Schlupf ihre Maxima erreichen (AR und RAHN, 1985). Das Ei selbst ist überflüssig geworden. Dieses „Wegwerfprinzip“ bezeichnen RAHN und AR (1980) als „wear and tear“.

Bei Krankheit, Mangelernährung, Parasitenbefall oder Schadstoffbelastung des Muttertiers ist der ausreichende Gehalt an essentiellen Stoffen im Ei sowie die Brutpflege nicht immer gewährleistet, so dass sich diese signifikant negativ auf die Überlebensrate der Nachkommen auswirken (WILSON, 1997). Vitamin-A-Mangel im Ei kann beispielsweise zu kardiovaskulären Missbildungen führen (ZILE, 2004). Bei der Kunstbrut hängt die erfolgreiche Entwicklung des Vogelembryos von der korrekten Temperatur, der Luftfeuchtigkeit der Umgebung, ihrer Sauerstoffsättigung sowie dem häufigen Wenden ab (GAULY, 1991). Suboptimale Bruttemperaturen können Verzögerung des Schlupfzeitpunktes, embryonale Fehllagen und verminderte Schlupfraten zur Folge haben, wobei leicht herabgesetzte Temperaturen anscheinend besser toleriert werden als zu hohe (DECUYPÈRE und MICHELS, 1992; FRENCH, 1997 und 2000; GRÖSCHL, 1998; GAULY, 1991; GAULY et al., 2001; KESSLER, 1998; SUAREZ et al., 1996).

Abhängig vom Grad der Selbständigkeit beim Schlupf unterscheidet man Nestflüchter und Nesthocker. Nestflüchter haben Daunen, können direkt nach dem Schlupf sehen, laufen und auf Futtersuche gehen. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Gänse und Enten (*Anseriformes*) und die Hühnervögel (*Galliformes*) mit den Wachteln. Nesthocker wie die Tauben- und Sperlingsvögel (*Columbi-* bzw. *Passeriformes*) sind beim Schlupf nackt und

blind, können sich nicht alleine fortbewegen und müssen gefüttert werden (HOYT und RAHN, 1980; VLECK et al., 1980; VLECK und VLECK, 1987). Zwischen diesen beiden Gruppen gibt es Übergangsformen.

### **2.2.3 Die Entwicklung des Vogelembryos**

#### **2.2.3.1 Die Keimblattbildung vor der Eiablage**

Da die Dottermasse ungefurcht bleibt, spricht man von einer partiellen diskoidalen Furchung. Unmittelbar nach der Befruchtung und Zygotenbildung finden während der Eileiterpassage die ersten Furchungsteilungen am animalen Pol der Dotterkugel statt und lassen die Keimscheibe entstehen. Unter der Keimscheibe entsteht die Subgerminalhöhle. Nur die zentralen Blastomeren der Keimscheibe werden zum Embryo; aus der Peripherie entstehen die Hüllen und Anhänge. In der Mitte der Keimscheibe befindet sich die *Area pellucida* mit der Peripherie, die später zur Gefäßzone, *Area vasculosa*, wird. Nach außen hin schließt sich die *Area opaca* an, die sich über das unbedeckte Dotterfeld, *Area vitellina*, ausbreitet. Von einer oberflächlichen Schicht kleiner Zellen - dem Ektoderm oder äußeren Keimblatt - bildet sich durch Abspaltung das innere Keimblatt (Entoderm). Beide beginnen die Dotterkugel zu umwachsen. In diesem Stadium der mehrschichtigen Keimscheibe, die bereits einige hundert Zellen umfassen kann, wird die Entwicklung durch die Abkühlung bei der Eiablage zunächst unterbrochen und erst später beim erneuten Erreichen der physiologischen Entwicklungstemperatur fortgesetzt (BROWN, 1988; STEINKE, 1983; SCHNORR und KRESSIN, 2001).

#### **2.2.3.2 Die Keimblattbildung nach der Eiablage**

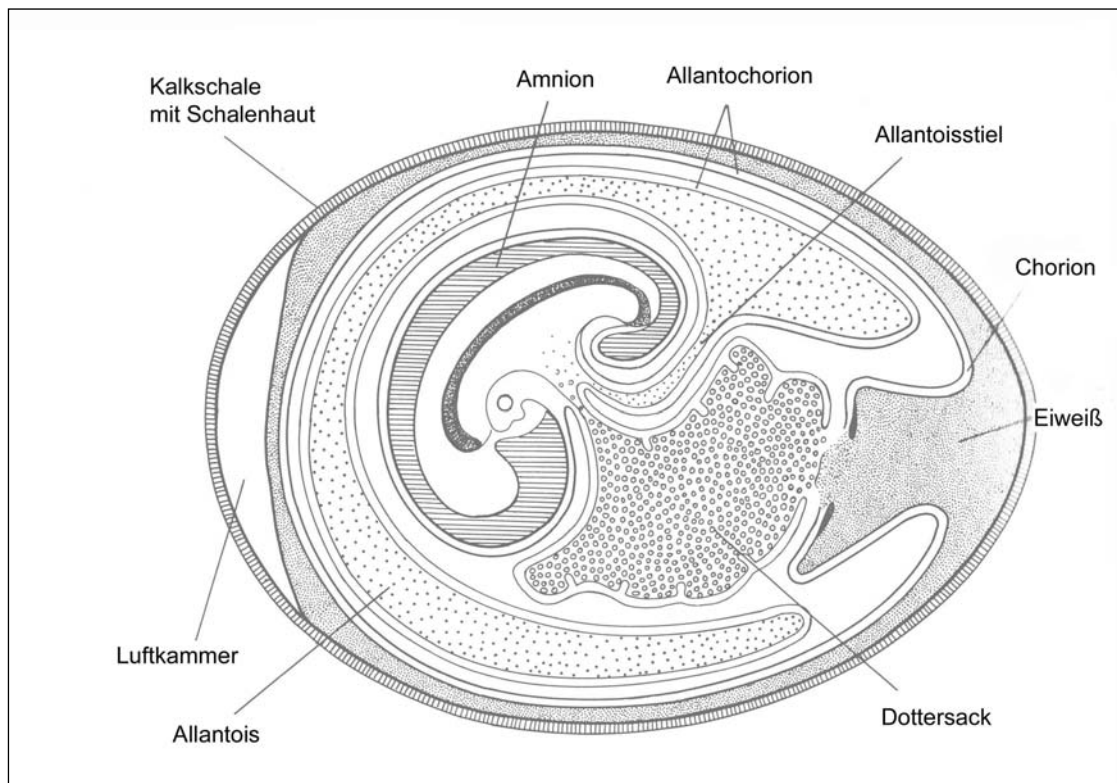
Am ersten Bebrütungstag entsteht in der Mitte der Keimscheibe durch Zellwanderung im Ektoderm der Primitivstreifen und gibt dem zukünftigen Embryo eine Längsachse. Aus ihm bilden sich Primitivrinne, Primitivknoten und Kopffortsatz, die später zur Grundlage von Neuralrohr, Gehirn und Nervensystem werden. Von diesen Strukturen wandern Zellen als mittleres Keimblatt (Mesoderm) zwischen die beiden anderen Keimblätter ein. Schon früh entstehen aus ihm die wichtigen Blutgefäße zur Versorgung des Embryos aus dem

Dotter. Aus dem Ektoderm entwickeln sich Oberflächenstrukturen (Haut, Federn etc.) und Sinnesorgane sowie das Zentralnervensystem und Kopfstrukturen. Aus dem Entoderm als innerem Keimblatt entstehen die Epithelien des Verdauungs-, Respirations- und Urogenitaltraktes sowie das Parenchym der sekretorischen Organe wie Leber und Pankreas. Das Mesoderm schließlich bildet die Grundlage für Skelett, glatte und quergestreifte Muskulatur, Herzmuskulatur, Gefäße, Blutzellen, Lederhaut, Bindegewebe, Nieren, Keimdrüsen, Mesothel der Eingeweide, Milz und die Auskleidung der Körperhöhlen (SCHNORR und KRESSIN, 2001).

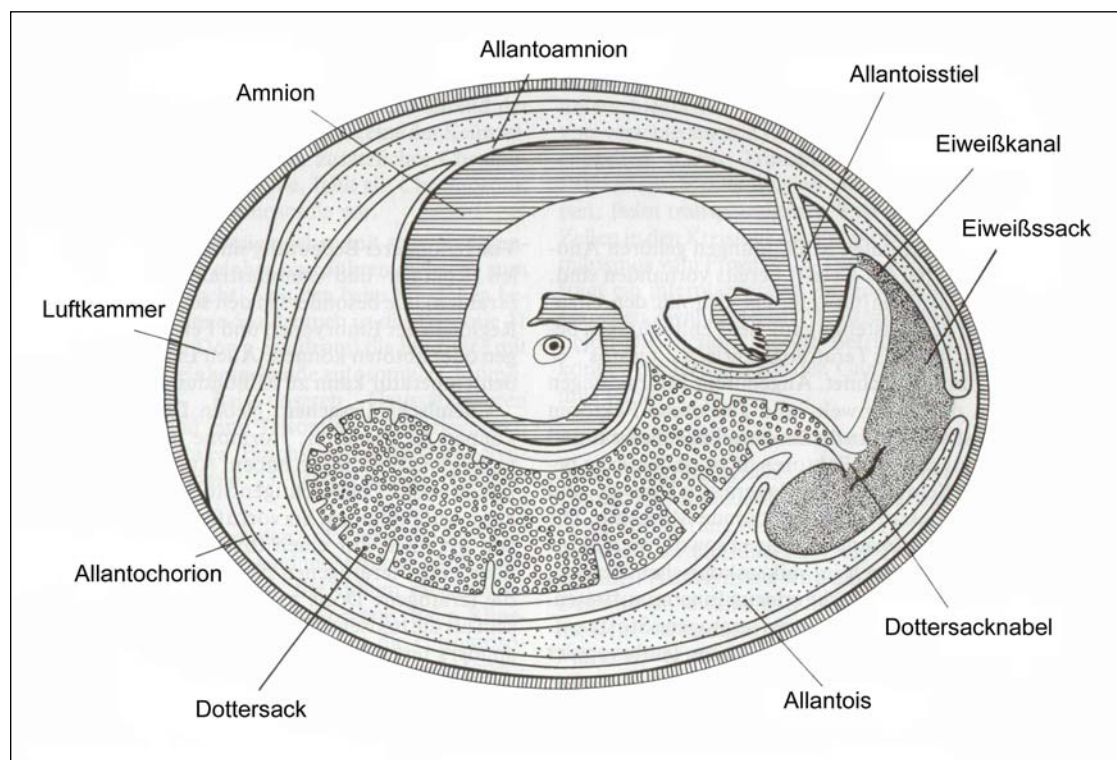
### 2.2.3.3 Embryonalhüllen und Versorgungskreisläufe

Reptilien und Vögel (zusammen bezeichnet als *Sauropsiden*) sowie Säugetiere bilden als Fruchthüllen das Chorion, das Amnion und die Allantois aus, weshalb diese Tiere auch als Amnioten bezeichnet werden. Die Hüllen dienen dem Schutz vor Austrocknung, der Ernährung und der Atmung des Embryos. Dottersack, Chorion und Amnion sind Faltungen der Keimblätter, die Allantois eine sekundäre Ausstülpung des Enddarms. Der Dottersack entsteht beim Vogel durch die Umwachsung des Dotters durch die Keimblätter, doch lange vor der Vollendung der Umwachsung entstehen im viszeralem Mesodermblatt Blutinseln und Blutgefäße, die dann Anschluss an das intraembryonale System finden und den sehr gut entwickelten Dottersackkreislauf mit den *Aa.* und *Vv. Vitellinae* bilden. Sauropsidenembryonen werden durch die Aufnahme des Dotters ernährt, der somit bei ihnen die Rolle der Plazenta übernimmt. Mit Fortschreiten der Entwicklung schrumpft der Dottersack immer mehr, bevor er schließlich kurz vor dem Schlüpfen in die Bauchhöhle gezogen wird und als Energiereserve für die erste Zeit nach dem Schlupf dient. Beim adulten Vogel erinnert noch das Meckelsche Divertikel am Jejunum als Rest des Dottersackstiels an seine Existenz.

Das Amnion entsteht durch Faltung und bildet die Amnionhöhle, in der der Vogelembryo schwimmt. Die Allantois als Ausstülpung des Enddarms breitet sich im extraembryonalen Coelom aus, legt sich dem Chorion an und verwächst mit ihm zum Allantoichorion, das sich der Schalenhaut anlegt. Zeitgleich entsteht der funktionsfähige Allantoiskreislauf mit den *Aa.* und *Vv. umbilicales*, über den der Gasaustausch des Embryos stattfindet. Die Abb. 2-3 und 2-4 zeigen schematisch die Embryonalhüllen beim Huhn zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung.



**Abb. 2-3:** Embryonalhüllen des Huhnes am 10.-11. Bebrütungstag, schematische Darstellung (aus SCHNORR und KRESSIN, 2001, nach DUVAL, 1889)



**Abb. 2-4:** Embryonalhüllen des Huhnes am 14. Bebrütungstag, schematische Darstellung (aus SCHNORR und KRESSIN, 2001, nach FEHER, 1975)

#### 2.2.4 Physikalische Grundlagen des embryonalen Gasaustauschs

Zu Beginn der embryonalen Entwicklung ist der Sauerstofftransport noch nicht hämoglobinabhängig. Die *Area vasculata* in der Peripherie der Keimscheibe dient bis zur Entstehung des Allantochorions als Atmungsorgan, wobei sie weniger effizient als dieses in der Aufnahme von Sauerstoff ist, ihn jedoch leichter wieder an das Gewebe abgeben kann (CIROTTO und ARANGI, 1989). Das Allantochorion als Fusion aus Chorion und Allantois (FARNER et al., 1982) übernimmt die Atmungsfunktion beim Huhn ab dem fünften Bruttag und kleidet ab dem zwölften Bruttag die komplette Innenseite des Eis aus. Es enthält einen Gefäßplexus zum Austausch der Atmungsgase. Dieser Allantoiskreislauf führt venöses Blut aus der Allantoisarterie und arterielles Blut über die Allantoisvene (FARNER et al., 1982). Zwischen dem embryonalen Blutkreislauf und der Außenwelt liegen die Eischale mit ihren Membranen, das Allantochorion und das Kapillarendothel. Die Schale ist für den Großteil der Embryonalentwicklung unverzichtbar (NAITO und PERRY, 1989). Ihre Permeabilität wird durch mikroskopisch kleine Poren gewährleistet (AR und RAHN, 1985) und stellt einen Kompromiss zwischen maximaler Gasdurchlässigkeit und dem Schutz vor zu starker Austrocknung, Mikroorganismen und anderen schädlichen Einflüssen dar (FARNER et al., 1982; HOYT, 1987; TULLETT und DEEMING, 1982; WANGENSTEEN und RAHN, 1970/71). AR und RAHN (1985) fanden eine logarithmische Beziehung zwischen Frischeimasse und Anzahl der Poren.

Nach innen hin liegen der Schale die äußere und die innere Schalenmembran an (FARNER et al., 1982). Das Netzwerk ihrer langen Proteinfasern ist luftgefüllt, zieht sich über die gesamte Oberfläche des Allantochorions hinweg und umgibt den Embryo rundum mit einer Art dünnem Gaskissen (PAGANELLI et al., 1988, VISSCHEDIJK et al., 1988). Am stumpfen Ende des Eis ist dieser Raum zur Luftkammer erweitert. Die Permeabilität der Schale ist über der Luftkammer größer als an der restlichen Oberfläche (PAGANELLI et al., 1988), die Gaszusammensetzung im Luftspalt ist jedoch an jeder Stelle des Eis gleich (VISSCHEDIJK et al., 1988; WANGENSTEEN und RAHN, 1970/71). Das Gasvolumen im Luftspalt ist analog zum Alveolarraum der Lunge (AR und RAHN, 1985; PAGANELLI et al., 1988). Da jedoch noch keine Atemzüge und die damit verbundene Konvektion stattfinden, erfolgt der Austausch der Atemgase durch Diffusion mit den Partialdruckdifferenzen von Sauerstoff und Kohlendioxid als Triebkraft (PAGANELLI, 1980; PAGANELLI et al., 1988;

WANGENSTEEN und RAHN, 1970/71). Der Gasaustausch zwischen dem embryonalen Blut und dem Luftspalt erfolgt durch die Schichten des Allantochorionepithels und des sich daran anschließenden Kapillarendothels (PAGANELLI, 1980; WANGENSTEEN und RAHN, 1970/71).

Der Embryo ist in seiner Aufnahme von  $O_2$  und der Abgabe von  $CO_2$  stark von der Zusammensetzung der Umgebungsluft abhängig. Eine hypoxische Umgebung kann durch erhöhten Hämatokrit, verstärkte Kapillarisation des Allantochorions und reduzierten  $O_2$ -Verbrauch teilweise ausgeglichen werden. So können Vögel noch in Höhen von bis zu 6500 m erfolgreich brüten. Solche Bedingungen führen zu einem erhöhten ATP-Verbrauch der embryonalen Erythrozyten; gleichzeitig sinkt die embryonale Stoffwechsel- und Schlupfrate (LEON-VELARDE und MONGE, 2004). Nach vier Stunden in einer Umgebung mit einem  $O_2$ -Gehalt von lediglich 10 % sterben die Embryonen selbst dann ab, wenn die Schale schon eröffnet ist (TAZAWA et al., 1992). Auf unphysiologisch hohe Bruttemperaturen reagieren die Embryonen mit einer reduzierten eigenen Wärmeproduktion (JANKE et al., 2002). An einen erhöhten  $CO_2$ -Partialdruck sowie an große Schwankungen in Luftfeuchtigkeit und Temperatur der Umgebung kann sich der Vogelembryo kaum anpassen; sie haben deshalb entscheidenden Einfluss auf physiologische Austrocknung, Überlebens- und Schlupfrate.

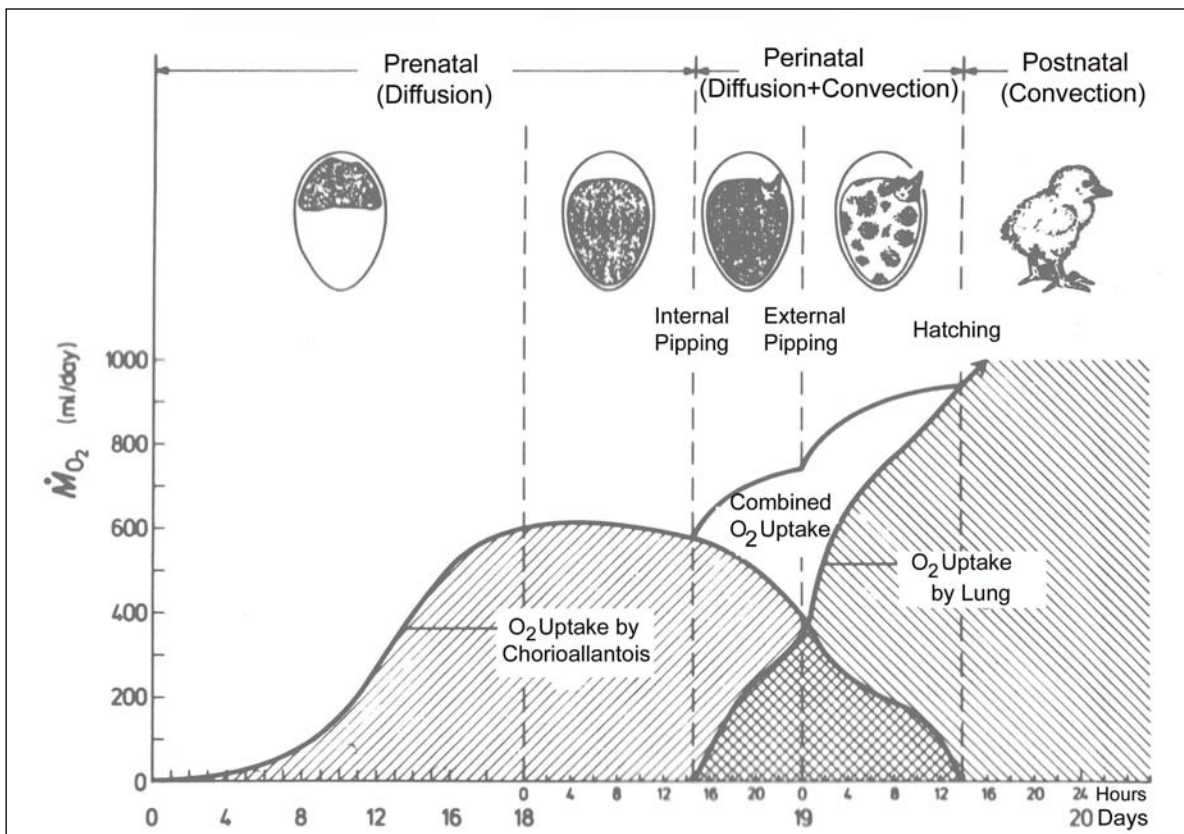
### **2.2.5 Der Übergang zur Lungenatmung**

Mit steigender Stoffwechselrate im Verlauf der Entwicklung ändern sich proportional zum steigenden Energiebedarf des Embryos die Partialdrücke von  $O_2$  und  $CO_2$  in der Luftkammer: Der  $O_2$ -Gehalt sinkt, während der  $CO_2$ -Partialdruck ansteigt (WANGENSTEEN und RAHN, 1970/71; RAHN et al., 1974). Wenige Tage vor dem Schlupf beginnt der Allantoiskreislauf allmählich zu veröden, und es kommt zum Anpicken der inneren Schalenmembran (internal pipping, IP). In dieser Phase ist die Stoffwechselrate nestflüchtender Arten durch eine typische Plateauphase gekennzeichnet, die bei Nesthockern nicht existiert (VLECK und VLECK, 1987). In einer Studie von NAIR et al. (1982) lag der Moment des IP bei der japanischen Wachtel im Schnitt 20-30 Stunden, bei Hühnerküken durchschnittlich 23 Stunden vor dem Schlupf. Die Küken atmen nach dem IP in die Luftkammer, wodurch die Parabronchen und die feinen Luftkapillaren ventiliert werden. In diesem Stadium der Embryonalentwicklung atmet der Embryo sowohl durch



Diffusion im Allantoiskreislauf als auch durch Konvektion in der sich entfaltenden Lunge (VINCE und TOLHURST, 1974). Das Atmen in die Luftkammer hinein ist ein notwendiges Übergangsstadium bei der Entfaltung der Lunge (FARNER et al., 1982).

Das Anpicken der äußeren Schale (external pipping, EP) erfolgte bei den Wachtelküken im Schnitt 7 Stunden, bei Hühnerküken 14 Stunden vor dem Schlupf. VINCE und TOLHURST (1975) beobachteten Atembewegungen und Rufen schon vor der eigentlichen Umstellung auf Lungenatmung. Nach dem Anpicken der Schale steht reichlich Sauerstoff für die Anstrengung des endgültigen Schlüpfens bereit. Die Sauerstoffaufnahme verlagert sich immer mehr vom Allantochorion in die Lunge, bis letztere am Ende des Schlupfes alleiniges Atmungsorgan ist und der Gasaustausch nur noch durch Konvektion stattfindet. Abb.2-5 zeigt den allmählichen Wechsel von Organ und Art der Sauerstoffaufnahme.

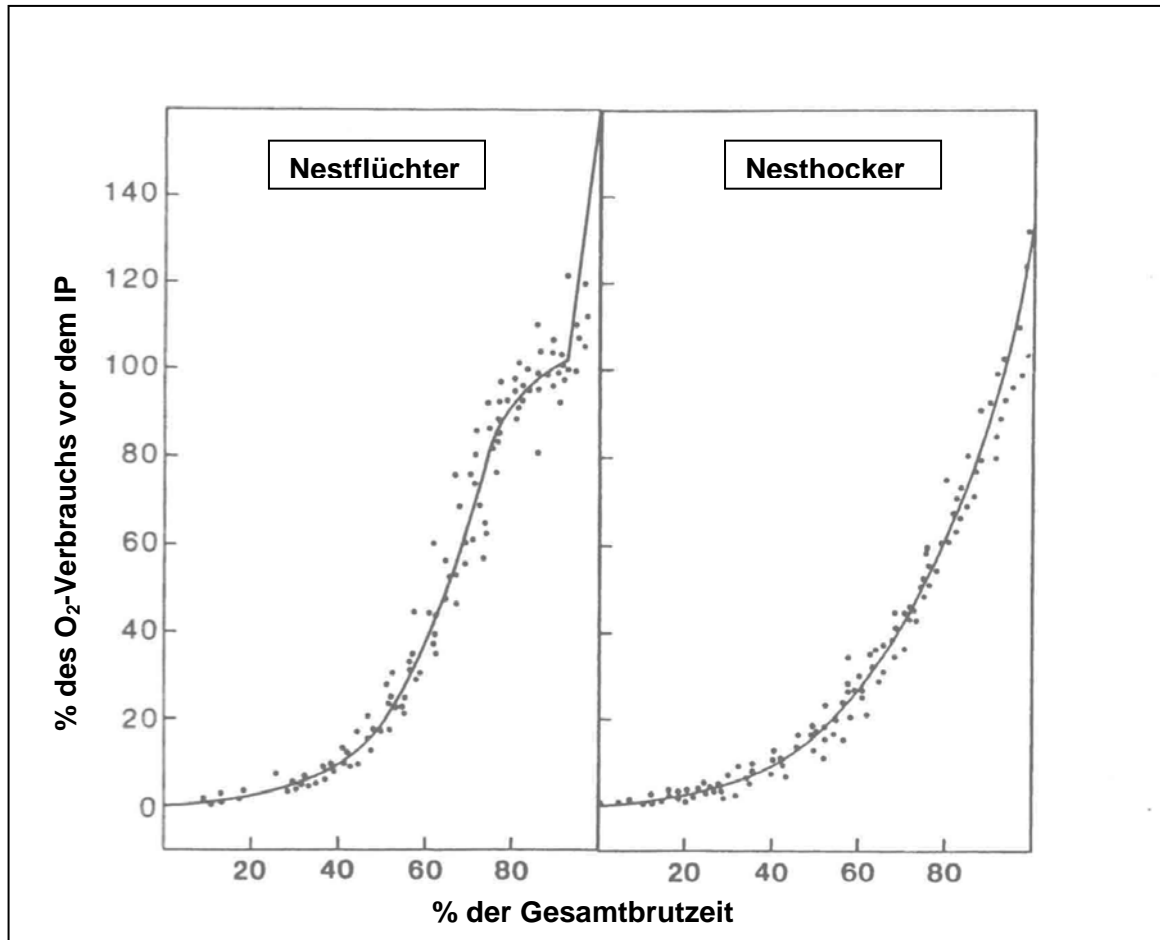




### 2.2.6 Untersuchungen zur embryonalen Atmung

In zahlreichen Studien ist die embryonale Atmung unterschiedlicher Vogelspezies bestimmt bzw. verglichen und auf allgemeingültige Zusammenhänge hin untersucht worden (AR und RAHN, 1978; FARNER et al., 1982; GAULY, 1991; GAULY et al., 2001; GRÖSCHL, 1998; HILLER, 1994; HOYT, 1987; HOYT und RAHN, 1980; KESSLER, 1998, MEYER, 2002; RAHN und AR, 1980; RAHN et al., 1974; REINER und DZAPO, 1995; VLECK et al., 1980; VLECK und VLECK, 1987). Der Embryo steht über die Atmung permanent mit der Außenwelt in Kontakt (FARNER et al., 1982). Wie bereits erwähnt, erfolgt der Gasaustausch durch Diffusion und ist abhängig von der Permeabilität der Schale und den Partialdruckdifferenzen von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> zwischen innen und außen (PAGANELLI, 1980; PAGANELLI et al., 1988; RAHN et al., 1974; WANGENSTEEN und RAHN, 1970/71). Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erlaubt direkte Rückschlüsse auf den Energiestoffwechsel des Embryos (VLECK et al., 1980).

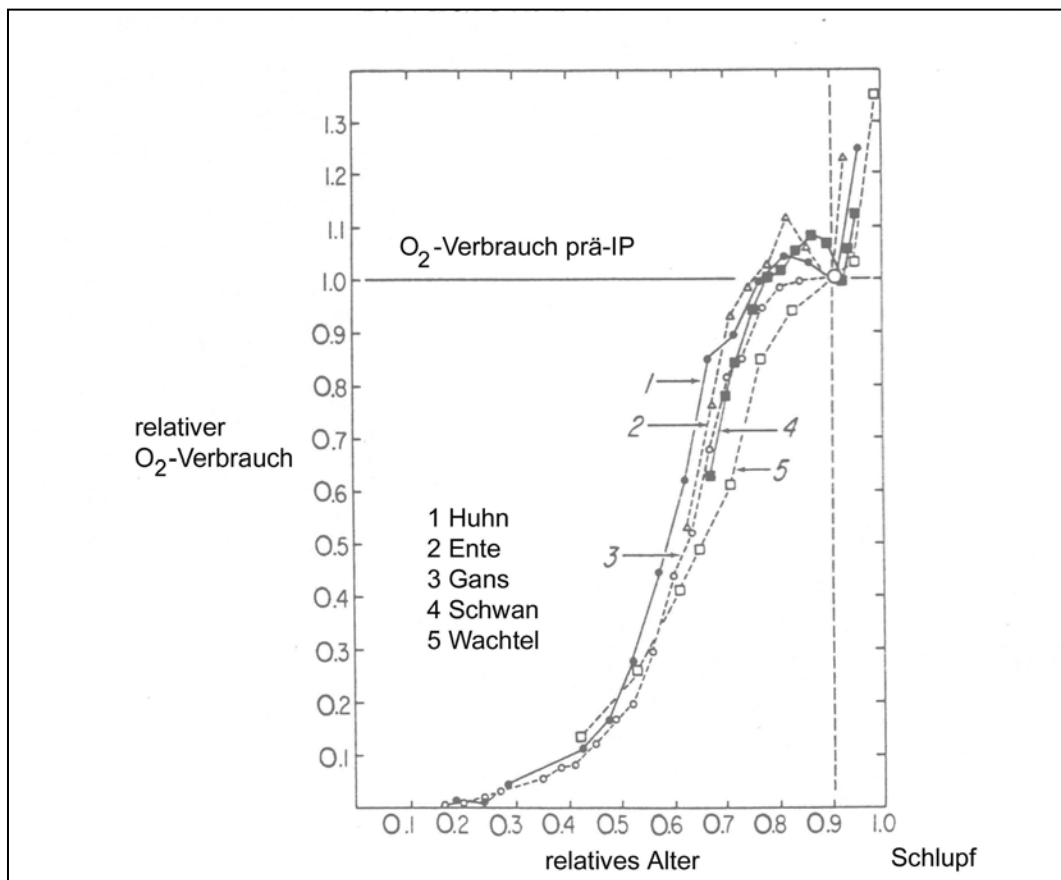
Der Energiegehalt im frisch gelegten Ei ist höher als im schlupfbereiten Küken samt Dottersack. Die Differenz der beiden Werte entspricht den Energiekosten der Entwicklung über die gesamte Brutzeit hinweg, die hauptsächlich für Wachstum und Erhaltungsbedarf anfallen (VLECK und VLECK, 1987). Nesthocker und Nestflüchter weisen grundsätzliche Unterschiede im Verlauf der Sauerstoffverbrauchskurve auf und können nur bedingt verglichen werden (HOYT, 1987; HOYT und RAHN, 1980; VLECK et al., 1980; VLECK und VLECK, 1987). Typisch für die Nestflüchter ist eine deutliche Plateauphase oder sogar ein Rückgang der Atmungs- und Stoffwechselrate gegen Ende der Brutzeit. Nesthocker weisen eine vergleichbare Plateauphase erst einige Zeit nach dem Schlupf auf (VLECK et al., 1980; VLECK und VLECK, 1987). Abb. 2-6 veranschaulicht diesen prinzipiellen Unterschied. Im folgenden soll lediglich auf die Nestflüchter eingegangen werden, da zu ihnen fast alle als Nutztiere gehaltenen Vögel und insbesondere die Wachteln gehören.



**Abb. 2-6:** Vergleich der embryonalen Sauerstoffverbrauchskurve von nestflüchtenden und nesthockenden Arten bezogen auf die relative Brutdauer (nach VLECK und VLECK, 1987)

RAHN et al. (1974) verglichen den Sauerstoffkonsum von neun Vogelarten und postulierten, dass der  $O_2$ -Verbrauch vor dem Anpicken der inneren Schalenmembran (internal pipping, IP) proportional zur Frischeimasse und umgekehrt proportional zur Gesamtbrutdauer sei. AR und RAHN (1978) sahen den Gesamtsauerstoffbedarf über die Brutzeit hinweg als konstantes Vielfaches der Frischeimasse bei etwa  $90 \text{ cm}^3 O_2 / \text{Gramm}$ . Die genannten Proportionalitäten und der Zusammenhang Frischeimasse- $O_2$ -Bedarf wurden weitgehend durch HOYT und RAHN (1980) bestätigt, die einen Sauerstoffbedarf von  $94 \text{ cm}^3 O_2 / \text{Gramm}$  Eimasse für die Brutzeit bis zur Plateauphase und von  $102 \pm 20 \text{ cm}^3 O_2 / \text{Gramm}$  über die gesamte Brutzeit errechneten. Weiterhin entwickelten sie eine Möglichkeit für den direkten Vergleich der Atmungskurven von Vogelembryonen mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten und unterschiedlichen absoluten Sauerstoffverbrauchswerten. Hierzu werden zwei Standardwerte als 1,0 bzw. 100 %

definiert: Die Dauer der Inkubationszeit bis zum Schlupf und der Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt des IP. Anschließend können die Atmungsrate und das Alter eines Embryos zu einem beliebigen Zeitpunkt als Anteile dieser Standardwerte betrachtet werden. Die entstehenden Kurven lassen sich in einem Diagramm übereinander projizieren und vergleichen, wie in Abb. 2-7 dargestellt. HOYT (1987) erstellte ein Modell zur Berechnung des embryonalen Energiestoffwechsels, das die Masse des Kükens und die Brutzeit als Variablen berücksichtigt.



**Abb. 2-7:** Vergleich des relativen Sauerstoffverbrauchs fünf nestflüchtender Arten bezogen auf das relative Alter (nach HOYT und RAHN, 1980)

GAULY und DZAPO entwickelten an der Justus-Liebig-Universität Gießen eine neue Methode zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Vogelembryonen (GAULY, 1991; GAULY und DZAPO, 1992). Das Prinzip der beheizbaren Messkammer mit Platin-Silber-Elektrode wird im Kapitel über Material und Methoden ausführlich vorgestellt. Es ist aufgrund seiner Nichtinvasivität für den Vogelembryo vergleichsweise schonend und wurde seitdem für Studien über den embryonalen Stoffwechsel von Fasanen (GAULY,

1991), Straußen (REINER und DZAPO, 1995), Hühnern (HILLER, 1994; KESSLER, 1998), Puten (GAULY et al., 2001; GRÖSCHL, 1998) und Flugenten (MEYER, 2002) genutzt. Hierbei konnte im Verlauf der Entwicklung durchweg zunächst ein Anstieg des  $O_2$ -Verbrauchs, eine Plateauphase kurz vor dem Schlupf und schließlich wieder ein Anstieg der Atmungsrate beobachtet werden. Die Werte für den durchschnittlichen Sauerstoffbedarf pro Gramm Frischeimasse für die gesamte Inkubationszeit bewegten sich bei dieser Messmethode von  $148 \text{ cm}^3 O_2/\text{gr}$  bei Fasanen (GAULY, 1991) über  $94 \text{ cm}^3 O_2/\text{gr}$  bei Hühnern (KESSLER, 1998) und  $77 \text{ cm}^3 O_2/\text{gr}$  bei Puten (GRÖSCHL, 1998) bis hin zu  $45 \text{ cm}^3 O_2/\text{gr}$  bei Straußen (REINER und DZAPO, 1995). Die Atmungsrate von Bruteiern weißer Legehennen lag um 11 % höher als die von Eiern brauner Hennen (KESSLER, 1998).

Der Einfluss variierender Vorbruttemperaturen auf den Sauerstoffverbrauch und andere Parameter wurde an Fasanen, Puten, Hühnern und Flugenten bestimmt. Höhere Bruttemperaturen führten stets zu einem erhöhten embryonalen Sauerstoffverbrauch (GAULY, 1991; GAULY et al., 2001; GRÖSCHL, 1998; KESSLER, 1998; MEYER, 2002) und waren teils positiv (GAULY, 1991; KESSLER, 1998), teils negativ (MEYER, 2002) mit der Lebendmassezunahme nach dem Schlupf korreliert. Suboptimale Bruttemperaturen führten meist zu erhöhter embryonaler Sterblichkeit und somit zu schlechteren Schlupfergebnissen, wobei sich leichte Abweichungen nach oben hierbei gravierender auswirkten als nach unten (GRÖSCHL, 1998; GAULY, 1991; GAULY et al., 2001; KESSLER, 1998).

Neben der gezielten Beeinflussung der embryonalen Stoffwechselaktivität wurde auch ihre Aussagekraft für spätere Eigenschaften der Tiere überprüft.

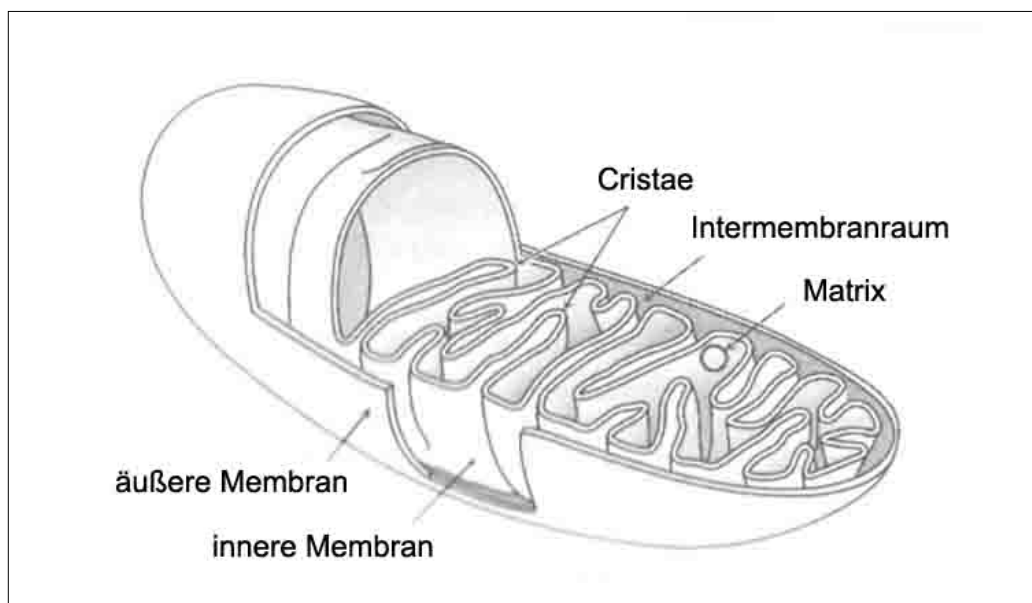
Zwischen der embryonalen Atmungsrate und der Lebendmasseentwicklung nach dem Schlupf fanden sich überwiegend positive Zusammenhänge (HILLER, 1994; KESSLER, 1998; MEYER, 2002). Bei Puten stellten sich diese jedoch eher negativ dar (GRÖSCHL, 1998). Die Zuchtwerte von Legehybriden für die embryonale Atmungsaktivität und für die spätere Legeleistung waren nicht signifikant korreliert (HILLER, 1994).

Allen durchgeführten Untersuchungen gemeinsam waren signifikante bis hochsignifikante Zusammenhänge zwischen der Atmung und der Vitalität der Vogelembryos. Die nicht schlupffähigen Tiere zeichneten sich schon vor ihrem Absterben durch einen unterdurchschnittlichen Sauerstoffverbrauch aus (GAULY, 1991; GAULY et al., 2001; GRÖSCHL, 1998; HILLER, 1994; KESSLER, 1998; MEYER, 2002; REINER und DZAPO, 1995).

## 2.3 Mitochondrien

### 2.3.1 Aufbau der Mitochondrien

Mitochondrien sind kugel- bis torpedoförmige Organellen, die durchschnittlich etwa 2 - 4  $\mu\text{m}$  lang sind und einen Durchmesser von 0,5 - 2  $\mu\text{m}$  haben, wobei es hier aber auch große Abweichungen nach oben gibt. Sie werden durch eine Doppelmembran vom Zytoplasma abgegrenzt. Die innere Membran umschließt den Matrixraum, in dem sich die ringförmige DNA (mtDNA), die Enzyme des Citratzyklus und der Fettsäureoxidation befinden. Abb.2-8 zeigt schematisch die Raumaufteilung im Mitochondrium. Das Kompartiment zwischen innerer und äußerer Membran bezeichnet man als Intermembranraum. Die äußere Membran enthält wie die meisten Eukaryontenmembranen viel Cholesterin und ist durch ihre zahlreichen spannungsabhängigen Kanäle (*voltage dependent anion channels*, VDAC) für die meisten Ionen und kleinen Moleküle gut passierbar. Die innere Membran ist außerhalb ihrer speziellen Transportproteine nahezu undurchlässig; ihre Reaktionsoberfläche wird durch zahlreiche Leisten (*Cristae*) und Einstülpungen (*Tubuli*) stark vergrößert. Die Innen- und Außenseite dieser Membran bezeichnet man auch als Matrix- und Zytosolseite, da die Außenseite vom Zytosol aus praktisch frei zugänglich ist. Die innere Mitochondrienmembran enthält die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (BERG et al., 2003).



**Abb. 2-8:** Schematische Darstellung der Raumaufteilung im Mitochondrium (nach BERG et al., 2003)

### 2.3.2 Aufgaben der Mitochondrien

Mitochondrien kommen im Zytoplasma aller kernhaltigen aeroben Zellen vor und nehmen eine Schlüsselstellung im Energiestoffwechsel des Organismus ein. Sie werden auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da in ihnen der überwiegende Anteil des energiereichen Moleküls ATP produziert wird (ANSLINGER und ROLF, 2003). In der mitochondrialen Matrix befinden sich die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren, der oxidativen Decarboxylierung und des Citratzyklus. Die beiden erstgenannten Reaktionen wandeln Lipide und Kohlehydrate in Acetyl-Coenzym A um, das anschließend in den Citratzyklus eingeschleust wird. Aus diesem gehen die energiereichen Moleküle  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  hervor, die jeweils ein Elektronenpaar mit hohem Übertragungspotential besitzen. Beim Transport dieser Elektronen durch die Enzyme der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran wird Energie frei, die zunächst in einem elektrochemischen Gradienten gespeichert wird und schließlich zur Synthese von ATP aus ADP dient. Diesen Vorgang bezeichnet man als oxidative Phosphorylierung (BERG et al., 2003; SARASTE, 1999; SLATER, 2003). Ein Molekül Glucose liefert auf diese Weise Energie für etwa 30 Moleküle ATP (HINKLE et al., 1991), während bei der anaeroben Fermentation nur zwei Moleküle ATP bereitgestellt werden können. Im Zytoplasma finden sich Mitochondrien dort gehäuft, wo besonders viel ATP verbraucht wird, zum Beispiel entlang von beweglichen Mikrotubuli oder im Sarkoplasma der Muskelzellen. In Geweben mit hoher Stoffwechselrate und Energieverbrauch wie Herz und Leber beträgt ihre Anzahl mehrere Tausend pro Zelle. Man weiß heute, dass Mitochondrien auch eine aktive Rolle beim Zelltod spielen, indem sie zunächst permeabel werden und anschließend Enzyme der apoptotischen Kaskade freisetzen (BERNARDI et al., 1999; BRANDON et al., 2005).

### 2.3.3 Herkunft und Vermehrung der Mitochondrien

Heutzutage gilt trotz einiger gegenläufiger Meinungen (EMELYANOV, 2003) die sogenannte Endosymbiontentheorie als gesichert. Sie besagt, dass Mitochondrien ebenso wie die Chloroplasten der Pflanzen von Bakterien abstammen, die von eukaryontischen Zellen aufgenommen wurden, wobei die Wirtszelle von Fähigkeiten wie der Photosynthese und der oxidativen Phosphorylierung profitierte. Im Gegenzug verlagerten sich die meisten der ehemals bakteriellen Gene in den Kern der Wirtszelle, so dass aus den Symbionten

semiautonome Zellorganellen wurden. Mitochondrien besitzen noch immer ihre eigene DNA (mtDNA). ANDERSON et al. (1981) entschlüsselten zuerst die 16.569 Basenpaare umfassende Sequenz des humanen Mitochondriums und bezeichneten sie als *Cambridge reference sequence (CRS)*. Mittlerweile wurde sie überarbeitet und teilweise korrigiert (ANDREWS et al., 1999; BRANDON et al., 2005), das System der CRS jedoch zur besseren Vergleichbarkeit individueller Daten beibehalten. Als Beweise für die Endosymbiontentheorie gelten die zahlreichen strukturellen und funktionellen Parallelen zwischen Mitochondrien und Bakterien sowie DNA-Sequenzierungen und phylogenetische Analysen.

Letztere haben ergeben, dass der obligat intrazelluläre Parasit *Rickettsia prowazekii* den Mitochondrien näher steht als alle übrigen bisher untersuchten Mikroorganismen (ANDERSSON et al., 1998). Dies unterstützt die Theorie, dass die Mitochondrien von einem Vorfahren der heutigen Rickettsien abstammen. Sie verfügen über autonome Systeme zur Proteinbiosynthese und für ihre Vermehrung durch Teilung. Das Cardiolipin der inneren Mitochondrienmembran ist sonst ein typischer Bestandteil von Bakterienmembranen. Weder Mitochondrien noch Rickettsien sind zur anaeroben Glykolyse fähig; die Enzyme und Mechanismen ihrer Atmungskette sind weitgehend vergleichbar (ANDERSSON et al., 1998).

Da Spermien ihre Mitochondrien nicht weitergeben, werden sie ausschließlich maternal vererbt und vermehren sich anschließend durch eigenständige Teilungsmechanismen (ANSLINGER und ROLF, 2003; BRANDON et al., 2005). Die mtDNA enthält die Informationen für einige Atmungskettenenzyme und weitere Proteine. 98 % der in den Mitochondrien enthaltenen Proteine und Enzyme, darunter auch wichtige Bestandteile der Atmungskette, werden allerdings von der DNA im Zellkern codiert, im Zytoplasma synthetisiert und dann ins Mitochondrium transportiert. Deshalb nimmt auch die väterliche Erbinformation entscheidenden Einfluss auf die Abläufe im Mitochondrium.

### **2.3.4 Prinzip und Ablauf der oxidativen Phosphorylierung**

In der Matrix des Mitochondriums entsteht bei der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat und bei der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren ein an das Coenzym A gebundener Acetylrest, kurz Acetyl-CoA genannt. Dieses Molekül tritt in den Citratzyklus ein und wird stufenweise zu  $\text{CO}_2$  oxidiert, wobei gleichzeitig die Coenzyme  $\text{NAD}^+$  und  $\text{FADH}$  zu

$\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  reduziert werden. Ein Acetyl-CoA-Molekül liefert auf diese Weise drei Moleküle  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und ein Molekül  $\text{FADH}_2$ . Diese Coenzyme sind Reduktionsmittel, da sie leicht ein Elektronenpaar an andere Moleküle abgeben, diese hierdurch reduzieren und selbst oxidiert werden.

Die oxidative Phosphorylierung findet an fünf Enzymen (Komplexe I bis V) statt, von denen die ersten vier die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran bilden, während Komplex V die ATP-Synthese katalysiert (Abb. 2-9). Die Coenzyme  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  geben ihre Elektronen an die Enzyme der Atmungskette ab. Die Elektronen werden in einem Redoxsystem weitergeleitet und schließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen, der hierdurch mit  $\text{H}^+$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  reagieren kann (BERG et al., 2003; SARASTE, 1999; SLATER, 2003). Es handelt sich um eine stufenweise ablaufende Knallgasreaktion, bei der sehr viel Energie frei wird. Die Zerlegung der Reaktion sorgt dafür, dass die jeweils freiwerdende Energiemenge für die Zelle unschädlich ist.

Die Enzymkomplexe I, III und IV der Atmungskette enthalten Protonenkanäle, durch die  $\text{H}^+$ -Ionen auf die Außenseite der inneren Mitochondrienmembran (in den Intermembranraum) transportiert werden. Dieser Transport ist endergonisch, da er gegen eine Konzentrations- und Ladungsdifferenz abläuft. Die benötigte Energie stammt aus den Redoxreaktionen des Elektronentransports; es handelt sich bei den Enzymkomplexen also um elektronengetriebene Protonenpumpen. Die hohe Konzentration von Protonen im Intermembranraum führt zu einem Überschuss an positiver Ladung und einem stark herabgesetzten pH-Wert. Dies wird als elektrochemischer Gradient bezeichnet, der eine gespeicherte Form von Enthalpie darstellt. Die elektronenmotorische wird in eine protonenmotorische Kraft (PMK) umgewandelt, die die Protonen zurück auf die Matrixseite treibt. Dieser energetisch günstige Rückfluss ist jedoch nur durch den Kanal der ATP-Synthase (Komplex V) möglich und treibt hierbei die ATP-Synthese an.

Das Prinzip der Kopplung von zwei Energieübertragungsmechanismen durch einen Protonengradienten wurde bei seiner Entdeckung als chemiosmotische Hypothese bezeichnet (MITCHELL, 1961). Dieses Prinzip kommt auch bei der Photosynthese, verschiedenen endergonischen Transporten und weiteren Mechanismen zum Einsatz. Der Protonengradient ist somit eine universell verwendbare Art der Energiespeicherung und -übertragung.



### 2.3.5 Der Weg der Elektronen

Abb.2-9 zeigt schematisch die Abläufe an den Komplexen I bis V der oxidativen Phosphorylierung.

Zu Beginn der Atmungskette überträgt das  $\text{NADH} + \text{H}^+$  sein Elektronenpaar auf die NADH-Q-Oxidoreduktase oder NADH-Dehydrogenase (Komplex I). Dieses Enzym enthält als funktionelle Gruppen ein Flavinmononucleotid und verschiedene Eisen-Schwefel-Cluster, die die Elektronen zum Coenzym Q weiterleiten. Die bei diesen Redoxvorgängen freiwerdende Energie wird dazu genutzt, vier Protonen ( $\text{H}^+$ ) durch einen Kanal im Komplex I in den Intermembranraum zu pumpen.

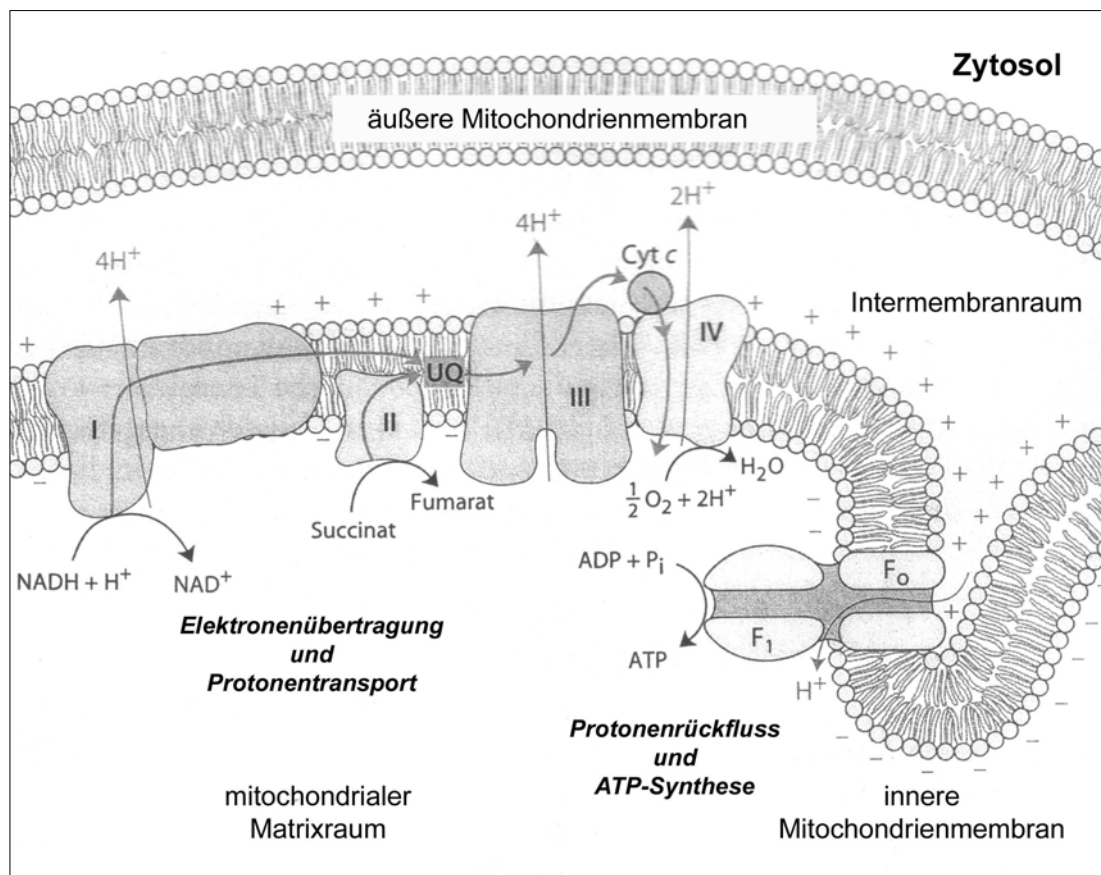
Der Komplex II (Succinat-Q-Reduktase) enthält die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus, die Succinat oxidiert und dabei  $\text{FAD}^+$  zu  $\text{FADH}_2$  reduziert. Dieses Coenzym gibt sein Elektronenpaar direkt an das Coenzym Q ab, so dass der Komplex I umgangen wird. Auch die Elektronen aus dem  $\text{NADH} + \text{H}^+$  der Glykolyse treten erst an dieser Stelle in die Atmungskette ein, da sie mit einem speziellen Shuttle-System in die Mitochondrien gelangen. Beim Coenzym Q handelt es sich um ein Ubichinon oder Ubiquinon (UQ in Abb. 2-9). Es kann in der lipophilen Membran gut diffundieren und transportiert die Elektronen zum Komplex III, der Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, kurz Cytochrom-Reduktase.

Im Komplex III gibt es drei Hämgruppen und eine Fe-S-Gruppe als Elektronenakzeptoren sowie einen Protonenkanal, durch den vier  $\text{H}^+$ -Ionen nach außen gebracht werden. Die Elektronen werden dann auf das Cytochrom c übertragen, ein kleines Protein mit einer Hämgruppe, das die Elektronen zur Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) transportiert.

Komplex IV enthält zwei Hämgruppen und zwei Kupferzentren, um die direkte Übertragung der Elektronen auf den molekularen Sauerstoff sicher durchführen zu können. Die freie Enthalpie aus der Reduktion des Sauerstoff wird an Komplex IV zum Transport von zwei Protonen in den Intermembranraum genutzt. Insgesamt werden so für jedes Elektronenpaar, das die Atmungskette vollständig von Komplex I bis IV durchläuft, zehn Protonen auf die Außenseite der inneren Mitochondrienmembran gepumpt.

Für Elektronenpaare, die erst an Komplex II in die Atmungskette eintreten, werden nur sechs Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Es entsteht an der inneren Mitochondrienmembran der oben erwähnte elektrochemische Gradient, der anschließend als Triebkraft für die ATP-Synthese an Komplex V wirkt (BERG et al., 2003; SARASTE, 1999; SLATER, 2003).

Bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser kann die Entstehung von zellschädigenden Sauerstoffradikalen (Superoxidanion, Peroxid) nicht vollständig vermieden werden. Diese werden jedoch durch die Schutzenzyme Superoxid-Dismutase und Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff abgebaut. Zudem wirken die Vitamine E und C als Antioxidantien (BERG et al., 2003).



**Abb.2-9:** Das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien: Elektronen werden in der Atmungskette stufenweise auf Sauerstoff übertragen und Protonen in den Intermembranraum transportiert. Die beim Rückfluss dieser Protonen freiwerdende Energie treibt die ATP-Synthese an (nach LEHNINGER et al., 2001)

### 2.3.6 Die Synthese und Ausschleusung von ATP

Die Synthese des ATP und seine Freisetzung in die mitochondriale Matrix werden von der ATP-Synthase katalysiert. Es handelt sich um ein Enzym mit einem komplizierten Rotationsmechanismus, der zu Beginn der 70er Jahre entdeckt wurde (BOYER et al., 1973; BOYER, 1989). Es besteht aus zwei Untereinheiten: Die  $F_0$ -Untereinheit mit dem Protonenkanal befindet sich in der inneren Membran, während die  $F_1$ -Untereinheit in die mitochondriale Matrix hineinragt und die Umwandlung von  $ADP + P_i$  zu ATP katalysiert (Abb. 2-9). Die Energie aus dem Protonenrückfluss wird hauptsächlich für die Ablösung des ATP von der  $F_1$ -Untereinheit verwendet. Beim Fluss durch den zweigeteilten Protonenkanal versetzen die Protonen einen Teil des Enzyms in Rotation und ermöglichen damit die Freisetzung des ATP. Für die Freisetzung von drei Molekülen ATP müssen zehn Protonen fließen, so dass sich ein Protonen-ATP-Verhältnis von 3,33:1 ergibt.

Die ATP-ADP-Translokase kombiniert die Ausschleusung des ATP aus den Mitochondrien ins Zytosol mit dem Eintritt von ADP. Da ATP eine negative Ladung mehr besitzt als ADP, wird bei diesem Austausch der Protonengradient vermindert, was einen Verlust gespeicherter Enthalpie bedeutet. Um dies auszugleichen, muss für den Transport eines jeden ATP-Moleküls aus dem Mitochondrium ein zusätzliches Proton in den Intermembranraum gepumpt werden, wofür etwa ein Viertel der Atmungskettenenergie verbraucht wird.

So ist für die Bereitstellung eines Moleküls ATP im Zytosol insgesamt die protonenmotorische Kraft (PMK) von 4,33 Protonen notwendig (HINKLE, 2005; HINKLE et al., 1991).

### 2.3.7 Bilanz der oxidativen Phosphorylierung und ADP/O-Quotient

Seit Bestehen der chemiosmotischen Theorie wurden immer wieder unterschiedliche Hypothesen zur Stöchiometrie der Redoxkette, der Protonenpumpen und der ATP-Synthese aufgestellt (BRAND et al., 1976; GARCIA-VALLVE, 2004; GUERRA, 2002; HINKLE, 2005; HINKLE et al., 1991; MITCHELL, 1961 und 1978; RACKER, 1980).

Der sogenannte ADP/O-Quotient gibt an, wie viele Moleküle ADP in ATP umgewandelt werden, wenn ein Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird, d.h. die ATP-Ausbeute pro Elektronenpaar. Dieser Quotient ist abhängig von der Stelle, an der die Elektronen in die

Atmungskette eintreten. Für jedes Elektronenpaar, das die gesamte Atmungskette von Komplex I bis zum Sauerstoff durchläuft, werden zehn Protonen in den Intermembranraum gepumpt: Vier an Komplex I, vier an Komplex III und zwei an Komplex IV (GARCIA-VALLVE, 2004; GUERRA, 2002; HINKLE, 2005; HINKLE et al., 1991). Elektronenpaare, die über das  $\text{FADH}_2$  an Komplex II in die Kette gelangen und Komplex I umgehen, liefern nur sechs Protonen. Wie bereits erwähnt, erfordert die Bereitstellung eines Moleküls ATP den Fluss von etwa vier (genaugenommen 4,33) Protonen. Die freiwerdende Enthalpie beim Rückfluss von zehn Protonen ermöglicht somit die Synthese und Ausschleusung von etwa 2,5 Molekülen ATP; der Fluss von sechs Protonen durch die ATP-Synthase setzt durchschnittlich 1,5 Moleküle ATP frei. Für die unterschiedlichen Eintrittsstellen der Elektronen in die Atmungskette ergibt sich demnach ein ADP/O-Quotient von etwa 2,5 bzw. 1,5.

Heute geht man davon aus, dass beim vollständigen Abbau eines Moleküls Glucose etwa 30 Moleküle ATP synthetisiert werden, nachdem die Angaben lange bei 36 Molekülen ATP gelegen haben (HINKLE, 2005; HINKLE et al., 1991). Bei der Glykolyse werden stets zwei Moleküle ATP frei, im Citratzyklus stets zwei Moleküle des gleichwertigen GTP. Für die oxidative Phosphorylierung ist die Berechnung etwas komplizierter: Die zwei  $\text{NADH}+\text{H}^+$  der Glykolyse, die über den Glycerin-3-Phosphat-Shuttle eingeschleust werden, sowie die zwei  $\text{FADH}_2$  aus dem Citratzyklus geben ihre Elektronenpaare an Komplex II an die Atmungskette ab und liefern jeweils nur sechs Protonen im Intermembranraum. Die zwei  $\text{NADH}+\text{H}^+$  aus der oxidativen Decarboxylierung sowie die sechs  $\text{NADH}+\text{H}^+$  aus dem Citratzyklus liefern jeweils zehn Protonen. Somit werden beim vollständigen Abbau eines Glucose-Moleküls insgesamt 104 Protonen in den Intermembranraum transportiert und mit ihrer protonenmotorischen Kraft 26 Moleküle ATP im Zytosol bereitgestellt. Zuzüglich des direkt in Glykolyse und Citratzyklus entstehenden ATP ergibt sich eine Bilanz von etwa 30 ATP (GARCIA-VALLVE, 2004; GUERRA, 2002; HINKLE, 2005; HINKLE et al., 1991).

### 2.3.8 Stadien der mitochondrialen Atmung und Atmungskontrolle

Für den Ablauf der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien müssen Sauerstoff, ADP,  $\text{P}_i$  und elektronenliefernde Substrate in ausreichender Menge vorhanden sein. Bei der Messung der mitochondrialen Atmungsaktivität *in vitro* werden diese Stoffe nach und nach

den isolierten Mitochondrien zugegeben, was zur Beobachtung der Stadien 1 bis 5 führt. Diese Stadien werden nach CHANCE und WILLIAMS (1956) folgendermaßen definiert: Nach Zugabe von Sauerstoff befinden sich die Mitochondrien zunächst im Status 1, der Sauerstoffverbrauch ist niedrig, da nur endogene Substrate veratmet werden können. Mit der Zugabe von Atmungskettensubstraten wie Succinat oder Glutamat-Malat beginnt der Status 2 mit einem leichten Anstieg des Sauerstoffverbrauchs. Kommen schließlich Phosphat und ADP als Phosphatakzeptor hinzu, beginnt die Phase der aktiven oder unkontrollierten Atmung, die unter Anwesenheit aller benötigter Substrate abläuft und als Status 3 bezeichnet wird. Nach der vollständigen Phosphorylierung des zugesetzten ADP zu ATP spricht man vom kontrollierten Status 4 mit deutlich reduziertem Sauerstoffverbrauch. Bei geringer Atmung infolge Sauerstoffmangels spricht man vom Status 5.

Die wichtigsten limitierenden Faktoren für den Ablauf der oxidativen Phosphorylierung bleiben jedoch das Vorhandensein von ADP und die Ausschleusung von ATP durch die Translokase (JACOBUS et al., 1982). Ein Überschuss an ATP bzw. ein Mangel an ADP hemmt die ATP-Synthese und somit den Protonenrückfluss. Hierdurch wird auch der Fluss von Elektronen durch die Atmungskette zum Sauerstoff gebremst, und die oxidierte Form der Coenzyme  $\text{NADH}^+$  und  $\text{FAD}^+$  wird nicht mehr regeneriert, was zu einem Substratmangel im Citratzyklus führt. Durch diese Kopplung von Verbrennung und ATP-Synthese durch den Protonengradienten wird verhindert, dass sich nicht benötigte Endprodukte anhäufen. Umgekehrt führt ein hoher ADP-Spiegel zu einer gesteigerten Rate der oxidativen Phosphorylierung und der vorausgehenden Reaktionen. Diese Vorgänge werden als Atmungskontrolle oder *respiratory control* bezeichnet. Der Atmungskontrollindex RCR (*respiratory control ratio*) ist der Quotient aus den Atmungsraten der Stadien 3 und 4 (BERG et al., 2003; CHANCE und WILLIAMS, 1955 und 1956; JACOBUS et al., 1982).

### 2.3.9 Störungen und Bedeutung der Mitochondrien

Die oxidative Phosphorylierung kann an verschiedenen Stellen durch hemmende Moleküle beeinflusst werden. Stoffe wie Rotenon, Antimycin A, Cyanid und Kohlenmonoxid unterbrechen die Atmungskette, Oligomycin hemmt die ATP-Synthase und somit indirekt auch den Elektronentransport. Auch bei einer Hemmung der ADP-ATP-Translokase z.B.

durch Atractylosid kommt die oxidative Phosphorylierung durch die Anhäufung von ATP im Mitochondrium zum Erliegen (BERG et al., 2003).

Zu einem stark gesteigerten Elektronentransport kommt es dagegen bei einer Entkopplung der Atmungskette von der Phosphorylierung. Dies bedeutet, dass Protonen an der ATP-Synthase vorbei in den Matrixraum zurückfließen können, wobei die gespeicherte Enthalpie des Protonengradienten in Form von Wärme frei wird. Der Sauerstoffverbrauch ist hierbei sehr hoch. Die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung kann im Organismus zur zitterfreien Wärmeerzeugung dienen, wobei die Protonen durch ein spezielles Entkopplungsprotein (UCP oder Thermogenin) zurückfließen. Bestimmte Moleküle sowohl endo- als auch exogenen Ursprungs (Dinitrophenol, Halothan, Thyroxin, Trijodthyronin u.a.) führen ebenfalls zu einem mehr oder weniger vollständigen Kurzschluss des Protonengradienten mit erhöhter Wärmeentwicklung, der in bestimmten Situationen biologisch sinnvoll, in anderen gefährlich für den Organismus ist.

Auch ohne exogene Einflüsse weist die mitochondriale DNA wegen ihres vergleichsweise häufigen Kontaktes mit Sauerstoffradikalen eine hohe Mutationsrate auf. Innerhalb einer Zelle können normale und mutierte Mitochondrien nebeneinander existieren (Heteroplasmie). Der im Laufe des Lebens zunehmende Prozentsatz mutierter Mitochondrien gilt heute als eine der möglichen Ursachen für degenerative Krankheiten verschiedener Organsysteme, Krebs und das Altern. Mit steigendem Anteil der Mutanten sinkt die Energieproduktion, und es werden vermehrt Sauerstoffradikale frei, was schließlich zur Auslösung der apoptotischen Kaskade und somit zum Zelltod führt (BRANDON et al., 2005). Diese Alterungsprozesse können durch Defizite der zellschützenden Enzyme oder durch Vitaminmangel beschleunigt werden. Auch vererbte Mitochondriendefekte können eine erhöhte Mutationsrate zur Folge haben. Zwar werden die Mitochondrien selbst ausschließlich maternal vererbt, aber oft haben diese Erkrankungen ihre Ursache in Veränderungen der Kern-DNA. Bei Mitochondrienkrankheiten mit einem Defizit der oxidativen Phosphorylierung kommt es typischerweise zu Mangelercheinungen in Geweben mit hohem Energiebedarf wie Herz, Zentralnervensystem und Leber, aber auch zu Muskelschwäche und -degeneration (BRANDON et al., 2005; CAWTHON et al., 2001; LEHNINGER et al., 2001).

Mit den zunehmenden Erkenntnissen über die Mitochondrien wird ihre wichtige Bedeutung immer klarer. Mitochondrien beeinflussen die Leistungsfähigkeit, mögliche Erkrankungen und die Lebenserwartung ihres Organismus. Die mtDNA ermöglicht wichtige Einblicke in die Evolution des Menschen und verschiedener anderer Spezies

(BRANDON et al., 2005). Nicht zuletzt erlaubt sie durch ihre hohe Widerstandsfähigkeit und ihre geradlinig maternale Vererbung die Bestimmung von Verwandtschaftsgraden, was unter anderem forensisch genutzt wird (ANSLINGER und ROLF, 2003). Moderne Software bietet heute Möglichkeiten zur Archivierung und Verarbeitung mitochondrialer Genomdaten (BRANDON et al., 2005) sowie zur Berechnung von Stoffwechselabläufen unter Simulation von *in-vivo*-Bedingungen (CORTASSA et al., 2003; AIMAR-BEURTON et al., 2001)

### 2.3.10 Versuche zum mitochondrialen Stoffwechsel

Seit den Anfängen der Erforschung der Atmungskette in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts (KEILIN, 1925) sind die Vorgänge in den Mitochondrien Gegenstand zahlreicher Publikationen geworden. Die Arbeiten von CHANCE und WILLIAMS (1956) zum mitochondrialen Stoffwechsel sind in grundlegenden Aspekten bis heute gültig. Ihr Prinzip der Einteilung mitochondrialer Atmungsaktivität in fünf Stadien wird noch immer zur Berechnung des Sauerstoffverbrauchs, des ADP/O-Quotienten und des Atmungskontrollindex verwendet. Weiterhin beschrieben sie als erste die polarographische Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mit einer vibrierenden Platinelektrode. Sie beobachteten bei intakten Mitochondrien einen schnellen Anstieg der Atmungsrate um das vier- bis zehnfache nach Zugabe von ADP bzw. entkoppelnden Substanzen (CHANCE und WILLIAMS, 1955). Ihre Erkenntnisse bilden die Grundlage für die im Folgenden verwendete Methode nach ESTABROOK (1967) zur polarographischen Messung und Berechnung mitochondrialer Stoffwechselaktivität.

Die Zusammenhänge zwischen mitochondrialem Stoffwechsel und Leistungsparametern der Tierzucht sind immer wieder das Ziel von Untersuchungen gewesen. An Reinzuchten und Kreuzungen von Kaninchen und Schweinen wurden die Phänomene der mitochondrialen Heterosis und der mitochondrialen Komplementation erforscht (DZAPO et al., 1973 und 1983; DZAPO und WASSMUTH, 1977, 1979 a und b, 1982, 1983, 1984).

Bei einer Überlegenheit der F<sub>1</sub>-Generation über die Elterngeneration sowohl in Leistungsmerkmalen als auch in Parametern des mitochondrialen Stoffwechsels spricht man von mitochondrialer Heterosis.

Bei der mitochondrialen Komplementation ist ein 1 : 1-Gemisch aus Mitochondrien der Parentalgeneration in seinen Stoffwechselleistungen dem rechnerischen Durchschnitt

beider Mitochondrienpopulationen über- (positive Komplementation) bzw. unterlegen (negative Komplementation). Züchterisch interessant wird dieses Phänomen, wenn sich aus den Messwerten des Gemischs Rückschlüsse auf die Leistungsfähigkeit der F<sub>1</sub>-Generation und somit Vorhersagen zur Kreuzungseignung bestimmter Tiere ableiten lassen.

In einer Studie an Kaninchen zeigte sich die mitochondriale Heterosis in den Lebermitochondrien bei den Merkmalen Atmungsrate, ADP/O-Quotient und einigen Enzymaktivitäten. Die Komplementation des *in vitro* erzeugten Gemischs aus Mitochondrien der Ausgangslinien war jedoch nicht in allen Merkmalen gleichsinnig mit der beobachteten Heterosis der Kreuzungsprodukte (DZAPO et al., 1973).

Bei Schweinen wirkten sich ATP-Mangel im Muskel, eine geringe Mitochondriendichte im Herzmuskel und ein zu hohes Verhältnis von anaerober Glykolyse zur oxidativen Phosphorylierung negativ auf die Vitalität der Tiere aus (DZAPO und WASSMUTH, 1977, 1979 a und b). Zudem stieg mit zunehmendem Alter der Anteil der Glykolyse in der Leber auf Kosten der aeroben Veratmung der Glucose (DZAPO und WASSMUTH, 1983), was zumindest theoretisch die Problematik verschärft. Die Messungen an Herzmitochondrien ergaben nicht immer reproduzierbare Ergebnisse, und die Atmung lief teilweise entkoppelt ab (DZAPO und WASSMUTH, 1983). Die Lebermitochondrien lieferten hingegen stabile Messwerte, wobei das Phänomen der mitochondrialen Komplementation für die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase, die Atmung im Status 3 und die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung bestätigt werden konnte (DZAPO und WASSMUTH, 1982). Eine statistisch abgesicherte mitochondriale Heterosis der F<sub>1</sub>-Generation trat bei den Messungen der Atmungsaktivität und des ADP/O-Quotienten in den Herz- und Hodenmitochondrien auf (DZAPO und WASSMUTH, 1983). Auf diese Ergebnisse hatte die Mutterlinie statistisch betrachtet einen größeren Einfluss als die Vaterlinie. Insgesamt konnten die Untersuchungen die These bestärken, dass ein Zusammenhang zwischen der Überlegenheit im mitochondrialen Stoffwechsel und der Heterosis bei Kreuzungstieren besteht. Die Ursache für die mitochondriale Heterosis wird in Interaktionen zwischen mitochondrialer und Kern-DNA gesehen (DZAPO und WASSMUTH, 1984).

Der mitochondriale Stoffwechsel nimmt jedoch nicht nur Einfluss auf den Organismus, sondern ist selbst abhängig von vielen Faktoren, zu denen Spezies, Rasse und Linie, aber auch Erkrankungen und exogene Einwirkungen zählen.

Im Vergleich von Hühner- und Rattenlebermitochondrien unter identischen Bedingungen waren die Vögel in der Atmungsrate und bestimmten Enzymaktivitäten überlegen und



wiesen einen höheren Entkopplungsgrad auf (BOBYLEVA-GUARRIERO et al., 1984). In einer Studie an Hühnern unterschiedlicher Nutzungsrichtung wurden Parameter der Atmungsaktivität von Lebermitochondrien mit dem Substrat Succinat untersucht. Die Broiler waren den Legehennen tendenziell bei der Mitochondrienproteindichte, bei der Atmungsaktivität im Status 3, im RCR und im ADP/O-Quotienten überlegen; diese Tendenzen konnten jedoch statistisch nicht abgesichert werden (BROWN et al., 1986). An Leghorn-Reinzuchtlinien und ihren F<sub>1</sub>-Hybriden fand SOMMER (1986) Zusammenhänge zwischen dem Lebensalter und der mitochondrialen Atmung bzw. dem ADP/O-Quotienten im Herzmuskel, wobei der erstgenannte Parameter bis zur 3. Lebenswoche, der zweite Parameter bis zur 6. Lebenswoche anstieg, um dann bis zur 12. Lebenswoche wieder zu fallen. Bei neugeborenen Ferkeln stieg der mitochondriale Sauerstoffverbrauch innerhalb von zwei Tagen an (MERSMANN et al., 1972).

Für die Tierzucht interessant sind vor allem mitochondriale Unterschiede innerhalb einer Population, die möglicherweise geeignet sind, Selektionsintervalle zu verkürzen und Kreuzungseignungen vorherzusagen. Mit dem Ziel einer möglichst frühen Selektion auf Leistungsvererbung wurden an 2400 Legehybriden Korrelationen zwischen Parametern des mitochondrialen Stoffwechsels und der Leistungsvererbung berechnet. Zwischen den Zuchtwerten für den mitochondrialen Energiestoffwechsel des Herzmuskels und den Legeleistungsparametern waren positive, jedoch nicht signifikante Tendenzen erkennbar (HILLER, 1994). SOMMER (1986) stellte an Legehybriden fest, dass die in der Legeleistung überlegenen Tiere auch gesteigerte Werte für den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und den ADP/O-Quotienten aufwiesen. In einer weiteren Untersuchung an Legehybriden wurden positive Zusammenhänge zwischen dem Sauerstoffverbrauch von Myokard-Mitochondrien und der Lebendmasseentwicklung errechnet (STEPHAN, 1993). MEYER (2002) fand bei männlichen Flugenten größtenteils positive Beziehungen zwischen der Mastleistung und der mitochondrialen Atmungsrate; diese waren jedoch überwiegend negativ mit dem RCR und dem ADP/O-Quotienten korreliert.

Mehrere Studien haben sich mit dem Einfluss exogener Faktoren auf den allgemeinen bzw. mitochondrialen Stoffwechsel befasst. Kälteakklimatisierte Entenküken wiesen eine teilweise Entkopplung der Atmung in den Muskelmitochondrien auf (ROUSSEL et al., 1998). Eine Verabreichung der Schilddrüsenhormone T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> führte ebenfalls zu einer teilweisen Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch und Wärmeproduktion (HWANG-BO et al., 1990). Mit dem Vergleich mitochondrialer Parameter an trainierten und untrainierten Tieren befassten sich

BRACKENBURY und HOLLOWAY (1991) sowie POWERS et al. (1992) an Hühnern bzw. Ratten. In der Beinmuskulatur von Hühnern bewirkte das Training keine signifikanten Veränderungen; bei den Ratten erhöhte sich in der trainierten Gruppe die SDH-Aktivität in Zwerchfellfasern.

In einer Studie an Hühnern zum Einfluss verschiedener Bruttemperaturen auf den späteren Stoffwechsel der Versuchstiere und ihrer Nachkommen waren die suboptimal bebrüteten Versuchsgruppen tendenziell den Kontrolltieren im mitochondrialen Sauerstoffverbrauch über-, in der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (ADP/O-Quotient) jedoch unterlegen. Es bestanden keine nachweisbaren Zusammenhänge zwischen dem mitochondrialen Stoffwechsel, der embryonalen Atmung, den Wachstums- und Legeleistungsparametern (KESSLER, 1998). Bei Puten aus drei Gruppen mit unterschiedlichen Bruttemperaturen traten gegenläufige Tendenzen zwischen der mitochondrialen Atmungsaktivität und dem ADP/O-Quotienten auf (GRÖSCHL, 1998; GAULY et al., 2001).

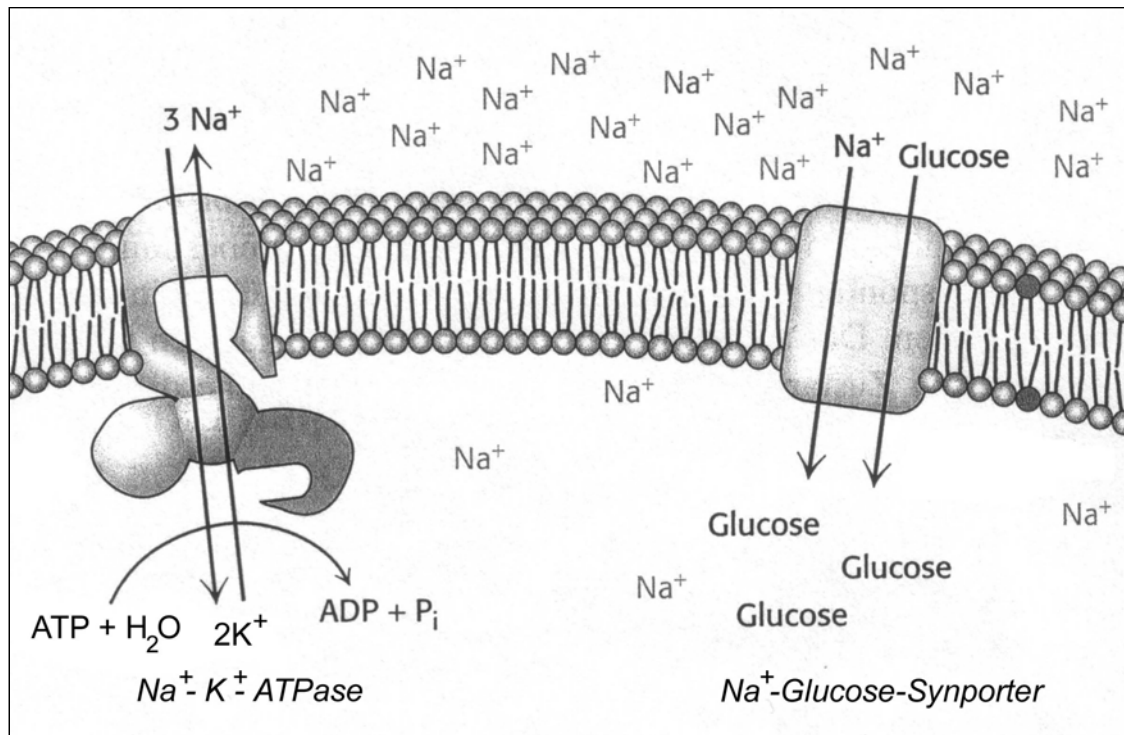
## 2.4 Die Natrium-Kalium-ATPase

### 2.4.1 Struktur und Funktion der Natrium-Kalium-ATPase

Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, auch Natrium-Kalium-Pumpe genannt, ist ein aktiver und somit energieverbrauchender Iontentransporter an der Zellmembran aller tierischer Zellen. Sie wurde 1957 von SKOU entdeckt. Dieser Mechanismus transportiert unter Hydrolyse von einem Molekül ATP drei Natrium-Kationen nach außen und im Gegenzug zwei Kalium-Kationen nach innen. Strukturell betrachtet ist die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase ein integrales Membranprotein mit zwei Untereinheiten. Durch permanente Ausschleusung von Natrium aus der und Einschleusung von Kalium in die Zelle entstehen deutliche Unterschiede zwischen der intra- und extrazellulären Konzentration dieser Ionen. Intrazellulär ist das Milieu von  $\text{K}^+$ -Ionen bestimmt (ihre Konzentration beträgt dort 140 mM), extrazellulär von  $\text{Na}^+$ -Ionen mit 145 mM. Intrazellulär beträgt die  $\text{Na}^+$ -Konzentration nur 12 mM und die extrazelluläre Konzentration an  $\text{K}^+$ -Ionen lediglich 4 mM. Dieses Ungleichgewicht bezeichnet man auch als Ionengradienten. Gleichzeitig entsteht ein elektrisches Membranpotential von  $-50$  bis  $-70$  mV (intrazellulär negativ gegenüber extrazellulär), da netto mehr positive Ladungsträger nach außen gepumpt werden. Dieses Membranpotential ist für die meisten tierischen Zellen charakteristisch und spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Weiterleitung von Aktionspotentialen in Nerven- und Muskelzellen (BERG et al., 2003; LEHNINGER et al., 2001; SCHEINER-BOBIS, 2002; SCHONER, 2002).

Zum Betrieb der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase wird viel Energie benötigt; ihr Bedarf macht auf den Gesamtorganismus bezogen etwa 20 % des ATP-Verbrauchs aus, im Nervengewebe sogar 50 %. Zahlreiche endergonische Ionen- und Stofftransporte im Organismus sind an den ATP-abhängigen  $\text{Na}^+$ -Gradienten gekoppelt (BERG et al., 2003; LEHNINGER et al., 2001; SCHEINER-BOBIS, 2002;).

$\text{Na}^+$ -Antiporter nutzen den Einstrom des Natriums entlang seines Konzentrationsgefälles, um Stoffe aus der Zelle herauszutransportieren, so z.B. der  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Antiporter der Zellmembran.  $\text{Na}^+$ -Synporter transportieren Stoffe in derselben Richtung wie das einströmende  $\text{Na}^+$ . Abb. 2-10 zeigt den  $\text{Na}^+$ -Glucose-Synport als Beispiel für einen endergonischen Transport, dessen Kosten indirekt die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase durch den Aufbau des  $\text{Na}^+$ -Gradienten trägt.



**Abb. 2-10:** Das Prinzip des sekundär aktiven Transports am Beispiel der Kopplung von  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  und  $\text{Na}^+-\text{Glucose-Symport}$ : Unter Verbrauch von ATP wird  $\text{Na}^+$  aus der Zelle hinaus transportiert. Der entstandene Ionengradient treibt den Transport von Glucose in die Zelle an (nach BERG et al., 2003).

An der Weiterleitung von Aktionspotentialen an Nervenzellen sind sowohl das Membranpotential als auch der Ionengradient beteiligt, beide aufrechterhalten durch die  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Pumpe}$ . Ein ankommendes Aktionspotential depolarisiert die Membran, d.h. die negative Ladung von ca.  $-60 \text{ mV}$  im Innern der Zelle wird abgeschwächt. Bei Erreichen des Schwellenwertes von ca.  $-40 \text{ mV}$  öffnen sich schlagartig spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle in der Membran, so dass  $\text{Na}^+$ -Ionen entlang des elektrischen und chemischen Gefälles einströmen können. Dies bewirkt eine weitere Depolarisation, so dass das Membranpotential sogar kurzzeitig positiv wird (ca.  $+30 \text{ mV}$ ). Diese Reaktion läuft nach Erreichen des Schwellenwertes lawinenartig nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ab. Doch schon nach  $1 \text{ ms}$  schließen sich die  $\text{Na}^+$ -Kanäle wieder, und es öffnen sich spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle, die  $\text{K}^+$  ausströmen lassen. Die Membran der Nervenzelle wird wieder auf ihren Ruhewert polarisiert, wobei die  $\text{Na}^+$ -Kanäle noch für eine Refraktärzeit von  $1 \text{ ms}$  inaktiviert bleiben. Während dieser Zeit kann kein Aktionspotential

mehr ausgelöst werden. Über Synapsen werden die Aktionspotentiale von Zelle zu Zelle weitergeleitet (BERG et al., 2003; LEHNINGER et al., 2001)

#### **2.4.2 Einflussfaktoren auf die Natrium-Kalium-ATPase**

Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase kann durch herzaktive Glykoside wie Ouabain gehemmt werden. Dies führt zu einem höheren  $\text{Na}^+$ -Spiegel in der Zelle und indirekt zu einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels. Am Herzmuskel steigert dies die Kontraktilität und wird in der Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt. Bei der Bestimmung von ATPase-Aktivitäten macht man sich dieses Prinzip zunutze, um die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase von der glykosidunempfindlichen Mg-ATPase zu unterscheiden. Mit dem Verfahren nach SCHARSCHMIDT et al. (1979) kann die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase aus verschiedensten Geweben bestimmt werden. Untersuchungen über humane  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase werden meist an Membranpräparationen aus Erythrozyten durchgeführt.

#### **2.4.3 Die Bedeutung der Natrium-Kalium-ATPase in der Neurologie**

Wegen der entscheidenden Bedeutung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase für die Signalübertragung im Nervengewebe wurde schon viel über ihre Rolle bei bestimmten neurologischen Phänomenen geforscht.

EL-MALLAKH (1983) stellte die Vermutung auf, dass eine leicht herabgesetzte Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe eine geringfügig höhere intrazelluläre Konzentration der Natriumionen zur Folge hat, was eine Annäherung des Ruhepotentials an den Schwellenwert und somit eine gesteigerte Erregbarkeit der Zelle bewirkt. Eine noch weiter abgesenkte Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe hätte nach dieser Theorie zur Folge, dass die intrazelluläre Konzentration der Natriumionen stark ansteigt und das Membranpotential permanent über dem Schwellenwert liegt, so dass die Zelle kein Aktionspotential mehr weiterleiten kann. Außerdem würde dies indirekt einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in der Zelle und eine gesteigerte Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt bewirken. Nach EL-MALLAKH (1983) könnten also Störungen der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase sowohl für eine erhöhte als auch für eine verminderte Erregbarkeit der Nervenzellen verantwortlich sein. Bei psychisch kranken Menschen mit bipolarer Störung (manisch-depressive Symptomatik)

werden sowohl Phasen gesteigerter als auch stark herabgesetzter neurologischer Aktivität vermutet. Zudem führte bei diesen Patienten in vielen Fällen die empirische Anwendung von Lithium-Salzen zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes (CADE, 1949; MAGGS, 1963; SCHOU, 1968). Wegen der engen chemischen Verwandtschaft von Lithium, Natrium und Kalium erschien hier ein Zusammenhang mit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  naheliegend, und es wurden zahlreiche Untersuchungen zu dieser Thematik durchgeführt (AKAGAWA et al., 1980; ALEXANDER et al., 1986; DICK et al., 1978; GLEN, 1968; HOKIN-NEAVERSON et al., 1975 und 1976; LINNOLIA et al., 1983; NAYLOR et al., 1973; REDDY et al., 1989; SENGUPTA et al., 1980). Die Ergebnisse der Studien sind insgesamt sehr uneinheitlich: Einige Arbeitsgruppen fanden eine verminderte Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Pumpe}$  bei Patienten mit bipolarer Störung (DICK et al., 1978; GLEN, 1968; HOKIN-NEAVERSON et al., 1975 und 1976; NAYLOR et al., 1973; REDDY et al., 1989). Andere wiederum fanden sie normal oder sogar erhöht (AKAGAWA et al., 1980; ALEXANDER et al., 1986; LINNOLIA et al., 1983; REDDY et al., 1989; SENGUPTA et al., 1980) bzw. stellten fest, dass sie während der symptomatischen Phase und auch bei unipolar depressiven Patienten verändert war, um sich in der symptomfreien Zeit wieder zu normalisieren (AKAGAWA et al., 1980; NAYLOR et al., 1973; REDDY et al., 1989). Weitere Hinweise auf eine Verknüpfung zwischen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität und zentralnervösen Störungen ergaben die Untersuchungen von RAPPORT et al. (1975), der in epileptischen Herden im Gehirn eine verringerte Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Pumpe}$  nachwies.

Neben pathologischen Zuständen gibt es im Tierversuch auch Hinweise auf Zusammenhänge zwischen der Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  und bestimmten Verhaltensweisen. So stellten OAKNIN et al. (1989) an männlichen Ratten erhöhte Aktivitäten der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  während des Sexualverhaltens fest.

## **2.5 Selektion, Verhalten und Stoffwechselphysiologie bei Nutzgeflügel**

### **2.5.1 Gründe und Voraussetzungen für eine Selektion auf Verhaltensmerkmale**

Die genetische Selektion von Tieren auf verbesserte Anpassung ihres Verhaltens an kommerzielle Haltungssysteme bietet ein großes und bisher nicht konsequent genutztes Potential zur Erhöhung von Wohlergehen und Produktivität in gleichem Maße (FAURE und MILLS, 1995 und 1998; FAURE et al., 2003; JONES und HOCKING, 1999; MIGNON-GRASTEAU und FAURE, 2002).

Die Leistungszucht bei Nutzgeflügel hat in manchen Linien zu Nebeneffekten in Form von unerwünschten Verhaltensweisen (Panikreaktionen, Federpicken, Kannibalismus) geführt. Gezielte Selektion kann solchen Tendenzen nicht nur entgegenwirken, sondern auch erwünschte Verhaltensmerkmale verstärken (FAURE et al., 2003; JONES und HOCKING, 1999; MIGNON-GRASTEAU und FAURE, 2002).

Allgemeine Verhaltensmerkmale wie Furchtsamkeit, Stressanfälligkeit und Sozialverhalten beeinflussen das Leben der Tiere in verschiedensten Situationen und Haltungssystemen. Sie bieten sich daher für eine Selektion an. Die direkten oder indirekten Messungen des Merkmals zur Auswahl der Zuchttiere müssen personell und finanziell realisierbar sein. Nicht zuletzt ist für den Selektionserfolg eine ausreichend hohe Heritabilität ( $h^2$ ) ausschlaggebend (FAURE und MILLS, 1995 und 1998; FAURE et al., 2003; MIGNON-GRASTEAU und FAURE, 2002).

Das realisierte  $h^2$  kann im Anschluss an jeden Selektionsversuch berechnet werden. Zuverlässige Schätzungen der Heritabilität eines Merkmals sind aber nur nach umfangreichen Messungen an Tieren einer gemeinsamen genetischen Herkunft möglich. Tab. 2-1 zeigt die errechneten bzw. geschätzten Heritabilitäten für die Merkmale der im folgenden beschriebenen Versuche. Bei diesen Experimenten sind zum Teil in Bezug auf ein bestimmtes Merkmal vollständig voneinander getrennte Linien entstanden. Diese Reinzuchtlinien mit unterschiedlichem Verhaltensmuster sind die Basis für die Suche nach den zugrundeliegenden Genen (MIGNON-GRASTEAU und FAURE, 2002).

## 2.5.2 Selektionsexperimente an japanischen Wachteln

### 2.5.2.1 Selektion auf lange bzw. kurze tonische Immobilität

Die Neigung zu starker Furchtsamkeit und Panikreaktionen führt in der Nutzgeflügelhaltung zu erheblichen Verlusten. Tiere, die im Umgang mit Artgenossen, betreuenden Personen und Umweltreizen zu Angst- und Fluchtreaktionen neigen, können sich und andere verletzen und leiden unter permanentem Stress. Dies verringert wiederum ihre Produktivität und ihre Wirtschaftlichkeit. Die verminderte Anfälligkeit für Furcht und Stress ist für Nutztiere generell vorteilhaft (FAURE et al., 2003; MIGNON-GRASTEAU und FAURE, 2002).

Als Möglichkeit zur Quantifizierung der allgemeinen Furchtsamkeit bei Geflügel bietet sich die tonische Immobilität „TI“ an. Hierbei handelt es sich um eine krampfähnliche Starre mit herabgesetzter Reaktionsfähigkeit bei starker Furcht, die eine für Hühnervögel typische Schutzreaktion auf Beutegreifer ist und auch manuell induziert werden kann. Frühere Beobachtungen (FAURE, 1982) lassen den Schluss zu, dass die Dauer der TI proportional zur Furcht des Vogels zum Zeitpunkt der Induktion ist. In der Geflügelforschungsstation des Nationalen Instituts für Agrarforschung (Institut National de la Recherche agronomique, INRA) in Nouzilly (Frankreich) selektierten MILLS und FAURE (1991) japanische Wachteln (*Coturnix japonica*) auf zwei Verhaltensmerkmale mit allgemeiner Aussagefähigkeit, von denen eines die tonische Immobilität war. Die Ausgangspopulation für alle Selektionsexperimente bestand aus Kreuzungstieren zweier kommerziell erhältlicher Wachtellinien. Eine festgelegte Anzahl Tiere aus dieser Population wurde auf die Dauer ihrer TI getestet.

Hierzu wurden neun bis zehn Tage alte Küken mit der Methode nach JONES und FAURE (1981) in einer speziellen Haltevorrichtung (Abb.2-11) auf den Rücken gelegt und zehn Sekunden lang vorsichtig fixiert, um die TI zu induzieren. Die Anzahl der notwendigen Induktionen und die Zeit bis zum selbständigen Aufrichten des Tieres wurden gemessen. Abhängig von der individuellen TI-Zeit wurden die Wachteln in zwei Gruppen (hohe bzw. niedrige Messergebnisse) eingeteilt. In der Gruppe der langen TI-Zeiten wurden von nun an stets die Tiere mit den höchsten Messwerten als Elterntiere für die nächste Generation eingesetzt, in der zweiten Gruppe wurde analog auf möglichst kurze Dauer der TI selektiert. So entstanden die Linien STI (short tonic immobility) und LTI (long tonic



immobility). Eine weitere Gruppe aus der ursprünglichen Population blieb unselektiert und diente als Kontrolllinie CON (FAURE und MILLS, 1995 und 1998; FAURE et al., 1996 und 2003; MILLS und FAURE, 1991).

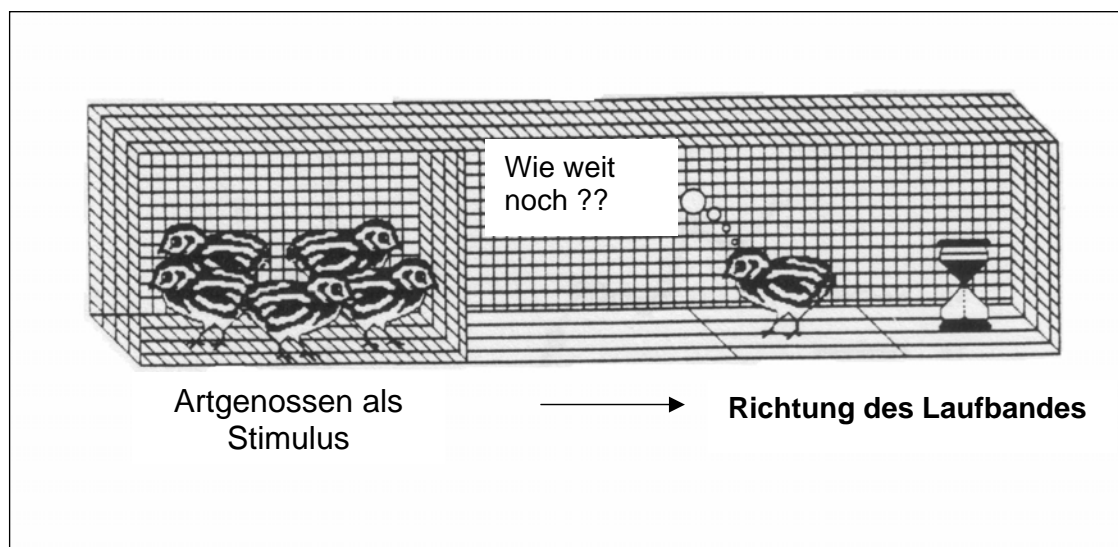


**Abb.2-11:** Tonische Immobilität in Haltevorrichtung (FAURE und MILLS, 2000)

Die drei Linien unterschieden sich ab der vierten Selektionsgeneration im Merkmal TI signifikant voneinander; ab der achten Generation überschritten sich die Standardabweichungen der Linien STI und LTI nicht mehr (MILLS und FAURE, 1991), so dass hier von der Entstehung zweier genetisch unterschiedlicher Populationen ausgegangen werden kann. Vor Beginn der Selektion betrug die durchschnittliche Dauer der TI etwa 50 Sekunden. Nach 20 Generationen dauerte die TI in der hohen Linie LTI durchschnittlich 216 Sekunden, in der niedrigen Linie STI nur 9 Sekunden; die Kontrolle wies weiterhin eine durchschnittliche TI-Dauer von etwa 50 Sekunden auf (FAURE und MILLS, 1998). Die STI-Tiere benötigten zudem signifikant mehr Induktionen zur Auslösung der TI (MILLS und FAURE, 1991). Die soziale Motivation (social reinstatement behaviour, SR) wurde von dieser Selektion nicht signifikant beeinflusst (MILLS und FAURE, 1991; FAURE und MILLS, 1998). Die Unterschiede in der Dauer der TI zwischen den Linien blieben über verschiedene Altersstufen hinweg bis hin zu den adulten Tieren signifikant (LAUNAY et al., 1993a). Die errechneten Heritabilitäten für die Dauer der TI finden sich in Tab. 2-1.

### 2.5.2.2 Selektion auf hohe bzw. niedrige soziale Motivation

In den heutigen Haltungssystemen der Geflügelwirtschaft kommt es oft zu Problemen durch große Gruppen, hohe Besatzdichten und die hieraus resultierenden Aggressionen der Tiere untereinander. Unter diesen Bedingungen sind Tiere mit ausgeprägtem Gruppeninstinkt im Vorteil, die aktiv die Nähe von Artgenossen suchen und sich ihnen nicht aggressiv nähern (FAURE und MILLS, 1995). Aus diesem Grund war die soziale Motivation (social reinstatement behaviour, SR) das zweite allgemeine Verhaltensmerkmal, auf das Wachteln des INRA in Frankreich selektiert wurden (MILLS und FAURE, 1991). Die Ausgangspopulation für die Selektion auf hohe bzw. niedrige soziale Motivation war dieselbe wie für die Etablierung der Linien STI und LTI am INRA in Nouzilly. Das messbare Merkmal war in diesem Fall die Bereitschaft der Vögel, sich für das Erreichen von Artgenossen anzustrengen. Bei sechs bis acht Tage alten Wachtelküken wurde in einem Versuchsaufbau mit Laufband (Abb.2-12) gemessen, welche Distanz sie auf dem Weg zu Artgenossen zurückzulegen bereit waren. Analog zur Selektion auf lange und kurze TI erfolgte eine Einteilung in getrennte Gruppen und Auswahl der Tiere mit den höchsten und niedrigsten Werten als Zuchttiere. So entstanden die Linien HSR (high social reinstatement) und LSR (low social reinstatement).



**Abb.2-12:** Versuchsaufbau der Selektion auf soziale Motivation (FAURE und MILLS, 1995)

In der unselektierten Ausgangspopulation  $F_0$  lag die auf dem Laufband zurückgelegte Strecke durchschnittlich bei ca. 14 m. Schon ab der ersten Selektionsgeneration  $F_1$  waren die Unterschiede im Merkmal soziale Motivation zwischen den Linien HSR und LSR signifikant; ab  $F_4$  unterschieden sich alle drei Linien signifikant voneinander, und ab  $F_8$  gab es nahezu keine Überschneidung der Standardabweichungen mehr (MILLS und FAURE, 1991). Nach 20 Generationen ( $F_{20}$ ) legten die Tiere der Linie HSR im Schnitt 59 m, die Tiere der Linie LSR nur 4 m auf dem Laufband zurück; die Kontrolle CON lag bei ca. 7 m (FAURE und MILLS, 1998). Diese Selektion hatte keine Auswirkungen auf die Dauer der tonischen Immobilität (MILLS und FAURE, 1991; FAURE und MILLS, 1998). Die Unterschiede zwischen den drei Linien LSR, CON und HSR blieben auch bei einer Wiederholung der Versuche mit adulten Tieren stets signifikant (LAUNAY et al., 1993a). Tab. 2-1 zeigt die errechneten Heritabilitäten für die Stärke der sozialen Motivation.

#### **2.5.2.3 Selektion auf hohe bzw. niedrige Stresshormonspiegel**

An der Louisiana State University in den USA arbeiten SATTERLEE und JOHNSON ebenfalls mit japanischen Wachteln, an denen sie unter anderem eine Selektion auf Stressempfindlichkeit durchführten. Hierzu wurden die Tiere einem definierten Stress (fünfminütige mechanische Immobilisation durch Fixieren in einem engen Käfig) ausgesetzt und anschließend der Plasma-Corticosteronspiegel bestimmt. Dieser biochemische Parameter gilt als Maß für die Intensität der individuellen Stressreaktion und lässt deshalb indirekt Rückschlüsse auf die Stressanfälligkeit der Tiere zu. Aus den Wachteln mit den höchsten Werten entstand die als HS (high stress) bezeichnete Linie; die Tiere mit den niedrigsten Werten bildeten die Linie LS (low stress). Es wurde eine unselektierte Kontrolllinie CON gehalten (SATTERLEE und JOHNSON, 1988). Die errechneten und geschätzten Heritabilitäten für den Stresshormonspiegel nach mechanischer Immobilisation finden sich in Tab. 2-1.

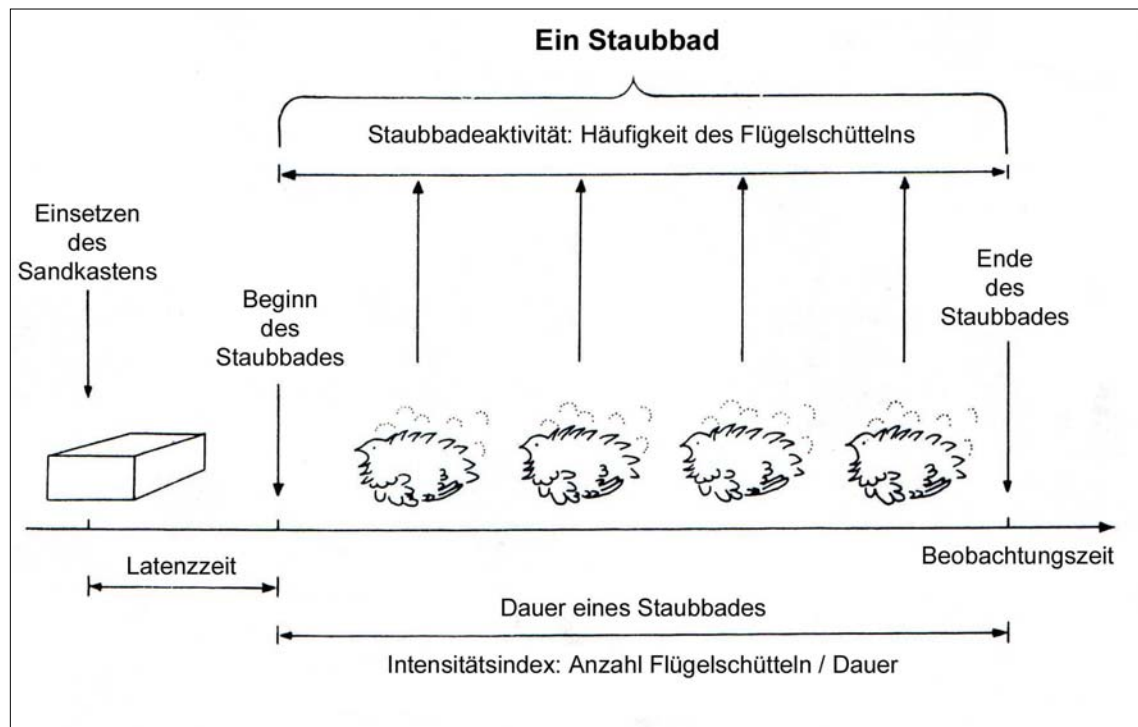
#### **2.5.2.4 Selektion auf hohe bzw. niedrige Staubbadeaktivität**

Das Staubbaden stellt einen festen Bestandteil des Verhaltensrepertoires der Hühnervögel dar, ist jedoch in der heute noch übergangsweise erlaubten Käfighaltung nicht möglich. In

Bonn führte GERKEN (1983) an japanischen Wachteln eine Selektion auf hohe bzw. niedrige Staubbadeaktivität durch.

Als „Staubbadeaktivität“ (SA) definierte sie nach einem Vorversuch die Anzahl des Flügelschüttelns pro Staubbad, da sich dieses Merkmal als einfach zu beobachten und gut wiederholbar herausstellte. Abb.2-13 zeigt die erfassten Merkmale während eines Staubbades. Zugunsten einer höheren Selektionsintensität fanden Beobachtung und Selektion ausschließlich an männlichen Tieren statt. Aus den Tieren mit der höchsten SA entstand die Linie H, die Tiere mit den niedrigsten Indizes wurden zu den Vatertieren der Linie N. Die unselektierte Kontrolle wurde als Linie K bezeichnet. Die Zweiwegeselektion führte bereits nach drei Generationen zu hochsignifikanten Unterschieden zwischen allen drei Linien im Selektionsmerkmal, wobei N stets die niedrigsten, H stets die höchsten und K stets intermediäre Werte aufwies. Die nicht selektierten Merkmale Staubbadedauer und -intensität (Anzahl des Flügelschüttelns pro Minute) entwickelten sich hochsignifikant gleichsinnig (GERKEN, 1983).

Das Experiment wurde zunächst bis in die neunte Selektionsgeneration fortgeführt (GERKEN und PETERSEN, 1987). Nach dieser Zeit betrug die Anzahl des Flügelschüttelns pro Staubbad bei Wachteln der Linie N im Durchschnitt etwa sieben, in der Linie K etwa dreizehn und in der Linie H etwa vierundzwanzig. Der Anteil der Tiere, die in der beobachteten Zeit kein Staubbad begannen, stieg in Linie N und sank in Linie H; diese „Nichtbader“ wurden allerdings von der Zucht ausgeschlossen. Die Werte für die Linie K lagen in allen Generationen zwischen den Werten von N und H. Die Staubbademerkmale Latenzzeit bis zum Beginn, Dauer und Intensität waren stets hochsignifikant positiv korreliert mit dem Selektionsmerkmal. (GERKEN, 1983; GERKEN und PETERSEN, 1987; GERKEN, 1991). Diese Ergebnisse zeigen, dass auch Verhaltensweisen, die als elementare und somit relativ starre Bedürfnisse gelten, durch Selektion beeinflussbar sind. Die errechneten und geschätzten Heritabilitäten für SA sind in Tab. 2-1 aufgeführt.



**Abb. 2-13:** Erfasste Verhaltensmerkmale während eines Staubbades (GERKEN, 1983)

**Tab. 2-1:** Realisierte und geschätzte Heritabilitäten von an Wachteln selektierten Verhaltensmerkmalen

<b>Tonische Immobilität TI</b>	$h^2$ realisiert	$h^2$ geschätzt	Quelle
LTI	0,24		FAURE et al., 1996 (Berechnungen nach acht Generationen)
STI	0,28		
<b>Soziale Motivation</b>			
HSR	0,43		
LSR	0,11		SATTERLEE und JOHNSON, 1988
<b>Stresshormonspiegel</b>			
HS	0,28-0,33	0,23	
LS	0,15-0,19	0,21	
<b>Staubbadeaktivität</b>			GERKEN, 1991 (Berechnungen nach 17 Generationen)
H	0,23	0,32	
N	0,16	0,28	

### 2.5.3 Korrelierte Auswirkungen der Selektion auf die Tiere

Verschiedene Studien haben sich mit den korrelierten Veränderungen verschiedener Merkmale der vorgestellten Wachtellinien befasst. Zur Untersuchung der allgemeinen Furchtsamkeit wurde die Aktivität der Tiere im Open Field beobachtet, die Zeit bis zu ihrem Auftauchen aus einer geschützten Umgebung gemessen und ihre Reaktion auf unbekannte Objekte, Geräusche, und Situationen bewertet. In Tests des Isolationsverhaltens sowie Messungen der Individualdistanzen und des Gruppeninstinkts wurde das Sozialverhalten quantifiziert. Des weiteren wurden Leistungsdaten, biochemische Parameter und genetische Charakteristika erfasst und analysiert.

#### 2.5.3.1 Auswirkungen der Selektion auf die Furchtsamkeit

Tiere der Linien STI und HSR waren aktiver im Open Field und leichter zu fangen als ihre Artgenossen der Linien LTI und LSR. Im Auftauchtest (Abb.2-14) kamen Wachtelküken der Linien STI, HSR und LS schneller aus einer dunklen Kiste hervor als Tiere der Linien LTI, LSR und HS (JONES et al., 1991; JONES et al., 1999; MILLS et al., 1993; MILLS und FAURE, 2000). Beim Einfangen sowie beim „Kieselsteintest“, in dem das Picken nach Steinchen als Zeichen für furchtloses Neugierverhalten gilt, gab es zwischen den Linien HS und LS keine signifikanten Unterschiede (JONES et al., 2004; SATTERLEE und JONES, 1997). Bei den Wachteln mit unterschiedlicher Staubbadeaktivität waren Tiere der Linie N bei der Konfrontation mit einem Bleistift in ihrem Käfig („Bleistifttest“), im Auftauchtest und bei der Induktion der tonischen Immobilität signifikant furchtsamer als Tiere der Linie H (GERKEN, 1983 und 1991; GERKEN und PETERSEN, 1985 und 1987; GERKEN et al., 1988).



**Abb.2-14:** „Auftauchtest“ mit der Hole-in-the-Wall-Box (FAURE und MILLS, 2000)

Auf ein drei Sekunden andauerndes unbekanntes Geräusch reagierten LTI-Wachteln im Gegensatz zu den STI-Tieren mit deutlichen Änderungen der Herzfrequenz und –amplitude (GAUDINIÈRE et al., 2002); ein unbekanntes Objekt im Käfig führte bei ihnen zu erhöhtem Plasma-Cortisolspiegel (FAURE et al., 1996; FAURE und MILLS, 1998).

LTI-Wachteln brauchten signifikant länger als STI-Tiere, um ein unbekanntes Futter zu akzeptieren (TURRO-VINCENT et al., 1995), wobei jedoch beide Linien gleich schnell eine Aversion gegen bitteres Futter erlernten (RICHARD et al., 2000). Tiere mit langer TI verfielen bei mechanischer Bewegungseinschränkung im Druckkäfig in Starre, während die STI-Wachteln eher mit Befreiungsversuchen reagierten (JONES et al., 1994). Wurden Tiere der Linien HS und LS erneut dieser Immobilisation ausgesetzt, so reagierten die HS-Wachteln häufiger mit Erstarren und zeigten von Mal zu Mal einen deutlichen Anstieg der Plasma-Corticosteronwerte, während die LS-Tiere eher zu Abwehrbewegungen neigten (JONES et al., 2000). In Kreuzungen der Linien HS, LS und CON hatten HS-Kreuzungen die höchsten Plasma-Corticosteronwerte nach Immobilisation; auch der maternale Einfluss war signifikant (ODEH et al., 2003 a und b).

### **2.5.3.2 Auswirkungen der Selektion auf das Sozialverhalten**

Junge Wachteln der Linie mit hoher sozialer Motivation HSR wiesen im Open Field signifikant geringere Individualdistanzen auf als die Tiere der LSR-Linie (FRANCOIS et al., 1999) und haben generell eine größere Tendenz, Artgenossen aufzusuchen (JONES et al., 1996). Dabei machen sie deutliche Unterschiede: Nur die Nähe von Tieren der gleichen Spezies wird gesucht (MILLS et al., 1995); darüber hinaus bevorzugen HSR-Wachteln die Nähe anderer HSR-Tiere (CARMICHAEL et al., 1998). Beide Linien sind in der Lage, zwischen einem Artgenossen aus ihrer eigenen Aufzuchtgruppe und einem fremden Tier zu unterscheiden, wobei die HSR-Wachteln gegenüber Fremden ein nicht-aggressives, neugieriges Verhalten an den Tag legten, während die LSR-Wachteln den Neuling eher ignorierten (JONES et al., 1996; FRANCOIS et al., 2000). Hatten die Wachteln die Wahl zwischen einem „kahlen“ Aufenthaltsort mit Sichtkontakt zu Artgenossen und einem einsamen, jedoch „attraktiven“ Bereich mit Futter, Wasser und Einstreu, so entschieden sich die HSR-Wachteln zwischen der 4. und der 6. Lebenswoche signifikant häufiger für die Nähe anderer Wachteln als die LSR-Tiere (FRANCOIS et al., 1998). Sie riefen auch mehr und eher nach Artgenossen, suchten verstärkt ihre Nähe und interagierten mit ihnen

(LAUNAY et al., 1991). Auf Isolation reagierten die HSR-Wachteln mit mehr Rufen und Hüpfen sowie mit deutlicher höheren Blut-Cortisolwerten als die Tiere der LSR-Linie (MILLS et al., 1993).

Die Gewöhnung an unbekanntes Futter wurde bei HSR-, nicht jedoch bei LSR-Tieren durch Artgenossen als Vorbilder beschleunigt (FAURE und MILLS, 1998).

Tiere der Linie H paarten sich signifikant öfter und waren tendenziell aggressiver gegenüber einer Wachtelkopffatratte als Tiere der Linie N.

### **2.5.3.3 Auswirkungen der Selektion auf Leistung, Biochemie und Genetik**

Während MIGNON-GRASTEAU und MINVIELLE (2003) keinen Zusammenhang zwischen der Dauer der TI und verschiedenen Legeleistungsparametern fanden, zeigten die STI-Wachteln in einer anderen Untersuchung von MINVIELLE et al. (2002) tendenziell höhere Legeleistungen und Gewichtszunahmen als die LTI-Tiere. LTI-Tiere reagierten auf Stress vor dem Schlachten mit erhöhtem pH und Tropfwasserverlust im Brustmuskel (REMIGNON et al., 1998). In den Linien HS und LS war die Geschwindigkeit der Bewältigung eines T-Labyrinthes positiv mit der täglichen Legeleistung korreliert (MARIN et al., 2002). Männchen der Linie LS wurden früher geschlechtsreif als Männchen der Linie HS (SATTERLEE et al., 2002). Die Selektion auf Staubbadeaktivität hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Leistungsparameter 12-Wochen-Gewicht, Alter beim ersten Ei, Legeleistung, Befruchtungs- und Schlupfraten der Bruteier (GERKEN, 1983 und 1991; GERKEN und PETERSEN, 1985 und 1987; GERKEN et al., 1988).

Auf der Suche nach möglichen Ursachen für die Varianz in der Dauer der TI hat man festgestellt, dass die Benzodiazepinrezeptoren im Vorderhirn der LTI-Wachteln eine höhere Bindungsfähigkeit als die der STI-Tiere aufweisen (HOGG et al., 1996).

Für die Intensität der sozialen Motivation ist möglicherweise der Corticotropine releasing factor „CRF“ mitverantwortlich (LAUNAY et al, 1993b).

Vergleichende DNA-Analysen an Reinzucht- und Kreuzungstieren der Linien STI und LTI haben die Existenz eines Gens für die Furchtsamkeit mit hoher Wahrscheinlichkeit belegt ( $P < 0,001$ ), so dass nun gezielt an der Entwicklung von Markern für QTL (Quantitative Trait Loci) gearbeitet wird. Langfristiges Ziel dieser Arbeit ist die Erstellung einer vollständigen Genkarte, wie sie für das Huhn bereits existiert, und die Identifikation der wichtigsten Genloci (ROUSSOT et al., 2001 und 2002).



#### 2.5.4 Sonstige Untersuchungen

In der Forschung über Zusammenhänge zwischen Selektion, Verhalten und Stoffwechselphysiologie gibt es zu Geflügel allgemein und zur japanischen Wachtel speziell noch zahlreiche weitere Untersuchungen. Beispielfhaft seien lediglich erwähnt: Broiler, die die Anfangsphase eines T-Labyrinths schnell meisterten, zeigten höhere Zunahmen als ihre langsameren Artgenossen (MARIN et al., 2003). Beim Vergleich einer schweren mit einer leichten Wachtellinie zeigten sich die leichten Tiere furchtsamer als die schweren (JONES et al., 1997). In einem Kreuzungsexperiment einer schweren mit einer leichten Wachtellinie waren die Kreuzungstiere weniger ängstlich als die Reinlinien und wichen hierin zum Teil erheblich vom Mittelwert der Elterntiere ab (ZIMMER-RÜHLE et al., 1992). Wachteln aus einer Linie mit hoher Laufaktivität waren schwieriger einzufangen als Tiere mit niedriger Laufaktivität (BESSEI et al., 1983). Männliche Wachteln einer Linie mit hoher Paarungsfrequenz hatten ein höheres durchschnittliches Körpergewicht, gesteigerte Aggressivität und größere Kloakaldrüsen als Tiere mit niedriger Paarungsfrequenz (YANG et al., 1998). Das Sexualverhalten von männlichen japanischen Wachteln konnte durch Verabreichung von Dopaminagonisten und –antagonisten beeinflusst werden (BALTHAZART et al., 2002).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten und nachstehend aufgelisteten Chemikalien wiesen pro-analytische Qualität auf und wurden von der *Sigma-Aldrich GmbH* (Taufkirchen) bezogen.

Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), bovines Serumalbumin (BSA), Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA), Glutamat-Malat, Kaliumchlorid, Kaliumphosphat, Laktatdehydrogenase (LDH), Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Natriumnitrat, reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid (NADH), Ouabain, Phosphenolpyruvat (PEP), Protease, Pyruvatkinase (PK), Saccharose, Succinat, Sucrose, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propanediol (Tris)

##### 3.1.2 Puffer und Lösungen

*Transport- und Isolationsmedium für die Leber- und Muskelproben (pH 7,5):*

Saccharose	250 mM
Tris-HCl	10 mM

*Inkubationsmedium zur Bestimmung der mitochondrialen Atmungsaktivität (pH 7,5):*

Saccharose	200 mM
Tris-HCl	5 mM
Kaliumphosphat	12 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	1 mM
NaCl	10 mM

*Medium zum Homogenisieren des Gehirns (pH 7,0):*

Sucrose	250 mM
EDTA	1,25 mM
Tris	10 mM

Reaktionspuffer 1 zur Aktivitätsbestimmung der Mg-ATPase (pH 7,4):

Tris	130,9 mM
EDTA	1,05 mM
NaCl	125,6 mM
KCl	13,09 mM
NaNO <sub>3</sub>	5,24 mM
NADH	0,52 mM
PEP	2,62 mM
Ouabain	1,06 mM

Reaktionspuffer 2 zur Aktivitätsbestimmung der Gesamt-ATPase (pH 7,4):

Tris	130,9 mM
EDTA	1,05 mM
NaCl	125,6 mM
KCl	13,09 mM
NaNO <sub>3</sub>	5,24 mM
NADH	0,52 mM
PEP	2,62 mM

*ATP-Lösung zur Aktivitätsbestimmung der ATPasen:*

ATP	200 mM
MgCl	200 M

### 3.1.3 Geräte

Brutapparat (*Schumacher, Lardenbach*), Clarkzelle mit Mikromagnetprüher und stationärer Platin-Silber-Elektrode (*Bachhofer, Reutlingen*), Glas-Teflon-Homogenisator Typ RM 22 (*Janke und Kunkel, Staufen*), Kompensationsschreiber L 6512 (*Linseis, Selb*), Kompensationsschreiber L 250 E (*Linseis, Selb*), Kühlzentrifuge mit SS 34 Rotor (*Sorvall*,

*Langenselbold*), Messkammer nach GAULY (1991) mit Platin-Silber-Elektrode (*Bachhofer, Reutlingen*), Nanoampèremeter Typ N23 (*Knick, Berlin*), Nanoampèremeter Typ N23/2 (*Knick, Berlin*), Spektrometer DU 64 (*Beckman-Coulter, Krefeld*), Wasserbad mit Thermostat (*Lauda Dr. R. Wobser GmbH, Lauda*), Wasserbad „Thermomix 1441“ (*B. Braun, Melsungen*)

### 3.1.4 Untersuchte Tiere und ihre Haltung

Die Untersuchungen fanden zunächst an Bruteiern japanischer Wachteln (*Coturnix japonica*), später an den hieraus geschlüpften Tieren statt. Die Bruteier wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Gerken und Herrn Prof. Dr. Petersen zur Verfügung gestellt. Sie entstammten drei Wachtellinien, die im Zuge eines Modellversuchs an der Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn etabliert worden waren. Im Rahmen verschiedener Untersuchungen (GERKEN, 1983; GERKEN und PETERSEN, 1987; GERKEN, 1991) wurden die Tiere über 17 Generationen hinweg einer Selektion auf hohe (Linie H) bzw. niedrige (Linie N) Staubbadeaktivität unterworfen; als Kontrolle wurde die unselektierte Linie K gehalten. Es wurden nur männliche Tiere beobachtet und selektiert, um die größtmögliche Selektionsintensität zu erreichen. Zur Quantifizierung der Staubbadeaktivität wurde in diesem Zusammenhang die Häufigkeit des „vertikalen Flügelschüttelns“ pro Staubbad erfasst, das eine aus mehreren schnellen Teilhandlungen bestehende charakteristische Bewegung ist.

Das Ausbrüten der Eier der Linien N, K und H sowie die Aufzucht und Haltung der Wachteln erfolgten auf der Lehr- und Forschungsstation „Oberer Hardthof“ der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

Bei den Messungen der embryonalen Atmungsaktivität fand zunächst ein Vorversuch mit 30 Bruteiern statt (neun Eier der Linie N, zwölf Eier der Linie K und neun Eier der Linie H), in dem der embryonale Sauerstoffverbrauch an jedem Tag des Brutverlaufs gemessen wurde. Im Hauptversuch wurden dann in drei Brutdurchgängen Messungen an weiteren 339 Eiern (107 Eier der Linie N, 106 Eier der Linie K und 126 Eier der Linie H) durchgeführt. Eier der Linien N, K und H wurden gleichmäßig auf die Durchgänge verteilt, um durchgangsbedingte Effekte statistisch zu eliminieren. Nach dem Schlüpfen wurden die Tiere gewogen und mit Flügelmarken individuell gekennzeichnet.

Zur Haltung der Wachteln diente ein Stall mit rechteckigem Grundriss (ca. 15,60 m x 6,50 m), der in acht Abteilungen von jeweils ca. 3,90 m x 2,70 m aufgeteilt war. Jeweils vier dieser Abteilungen lagen zu beiden Seiten eines Mittelganges für die Versorgung der Tiere. Es handelte sich um Bodenhaltung mit Sitzstangen aus Holz. Futter und Wasser wurden in Kükenlängströgen bzw. aus Stülptränken angeboten.

In der ersten Lebenswoche kamen Kükenringe und 24 Stunden-Dauerbeleuchtung zum Einsatz, um den Tieren eine gute Orientierung zu ermöglichen; die Umgebungstemperatur wurde durch Heizstrahler auf ca. 38 °C eingestellt und danach schrittweise um ca. 3 °C pro Woche bis auf ca. 25 °C abgesenkt. Auch die Beleuchtungsdauer wurde schrittweise gesenkt (18 h täglich in der zweiten Lebenswoche, 12 h täglich ab der dritten Lebenswoche). Die Fütterung erfolgte *ad libitum*, wobei in der 1. - 3. Lebenswoche kommerzielles Putenstarterfutter gemahlen und dann bis zur 6. Lebenswoche in pelletierter Form verabreicht wurde (Tab. 3-1). Im Alter von 6 Wochen wurde die Fütterung auf Legehennenfutter umgestellt.

**Tab. 3-1:** Fütterungsschema der Wachteln

Alter der Tiere	Art des Futters	Rohproteingehalt	Umsetzbare Energie pro kg
< 3 Wochen	Putenstarterfutter gemahlen	28 %	11,7 MJ
3- 6 Wochen	Putenstarterfutter pelletiert	28 %	11,7 MJ
> 6 Wochen	Legehennenfutter	18 %	13 MJ

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kunstbrut und Messung der embryonalen Atmungsaktivität

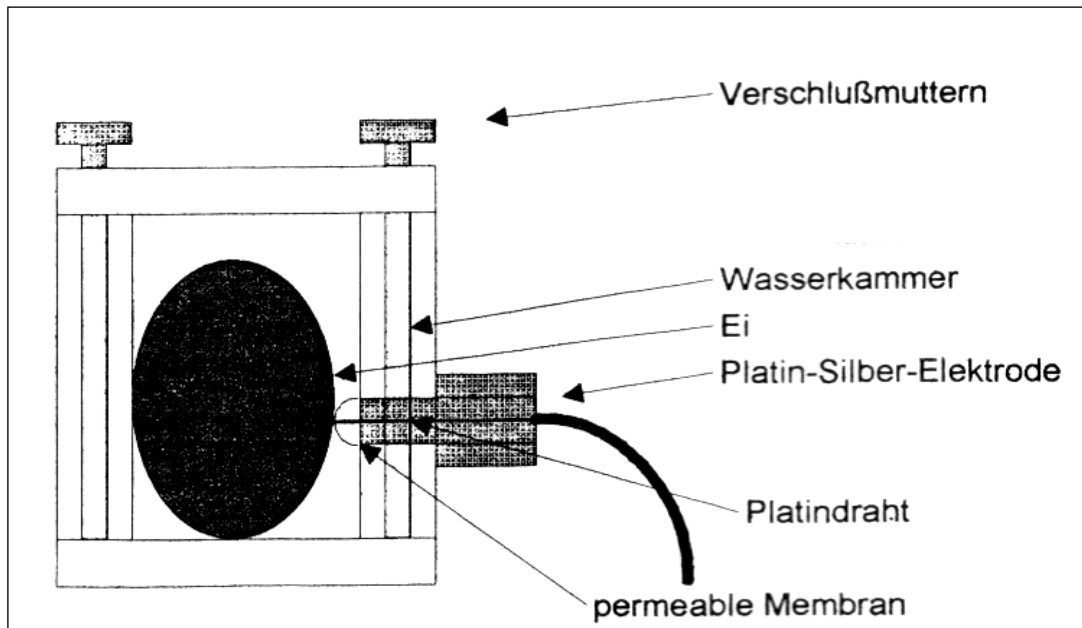
Die beschriebenen Messungen wurden in drei Durchgängen an 369 befruchteten Wachteleiern auf dem „Oberen Hardthof“ durchgeführt.

Die Eier wurden individuell gekennzeichnet, gewogen und das jeweilige Eivolumen mittels Wasserverdrängung in einem Messzylinder festgestellt. Anschließend erfolgte die Bebrütung in einem Schumacher-Brutapparat bei 37,8 °C, wobei die Luftfeuchtigkeit während der Vorbrut (Tag 1-12) auf 65 %, während der Schlupfbrut (Tag 13 - 16) auf 85 % eingestellt wurde. Am 15. Bruttag wurden die Eier in eine Schlupfhorde eingelegt, die ein individuelles Schlüpfen, Erkennen und Zuordnen der Küken ermöglichte.

Im Vorversuch wurde die embryonale Atmungsaktivität an jedem Bruttag, im anschließenden Hauptversuch am 7. und 12. Bruttag gemessen. Vor den Messungen wurden die Bruteier jeweils geschickt und abgestorbene Embryonen aussortiert. Die vor dem 7. Bruttag abgestorbenen Embryonen, bei denen keine Messung stattfinden konnte, gingen nicht in die Ergebnisse und statistische Auswertung ein.

Zur Bestimmung der embryonalen Atmungsaktivität wurde eine nach GAULY (1991) modifizierte Messkammer (Abb. 3-1) mit stationärer Platin-Silber-Elektrode nach CLARK verwendet, wegen dieser Elektrode auch als Clarkzelle bezeichnet. Zu Beginn eines jeden Messzyklus wurde die Kammer mit reinem gasförmigen Stickstoff gefüllt, um den Nullpunkt des Sauerstoffgehaltes festzulegen und die Kompensationsschreiber zu eichen. Anschließend wurde die Clarkzelle geöffnet und der Stickstoff wieder durch atmosphärische Luft ersetzt. Nach dem Verschließen der Zelle und dem Erreichen der Inkubationstemperatur stellte sich innerhalb von ca. 20 Minuten ein Gleichgewicht ein, das als Startpunkt bei hundertprozentiger Luftsättigung (Skt/Start) definiert wurde.

Nach diesen Vorbereitungen konnten die eigentlichen Messungen beginnen.



**Abb. 3-1:** Clarkzelle modifiziert nach GAULY (1991) aus KESSLER (1998)

Jedes Brutei wurde einzeln in die Messkammer eingelegt und diese luftdicht verschlossen. Die konstante Bruttemperatur der Eier von 37,8 °C wurde durch permanente Umspülung der Zelle mit warmem Wasser aufrecht erhalten. Der Sauerstoffabfall infolge der embryonalen Atmung im Inneren der Clarkzelle verursachte an der erwähnten Platin-Silber-Elektrode eine Spannungsschwankung und somit eine Änderung des Stromflusses, die durch ein Nanoampèremeter quantifiziert und von einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet werden konnte. Die Eier wurden durchschnittlich 15 Minuten in der Messkammer belassen. Aus den Aufzeichnungen des Kompensationsschreibers wurden anschließend die verbrauchten Einheiten Sauerstoff pro Stunde ( $\Delta$  Skt/h) mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{O}_2 \text{ in ml/h} = (\text{KaVol} - \text{EiVol}) \times \frac{c}{100} \times \frac{\Delta \text{Skt/h}}{\text{Skt/Start}}$$

KaVol = Kammervolumen

EiVol = Eivolumen

c = Sauerstoffgehalt in % der Luft

$\Delta$  Skt/h = Skaleneinheitenverbrauch pro Stunde

Skt/Start = Skalenteile bei Messbeginn

Im Anschluss an die Messungen wurden die Eier weiter bebrütet.

### 3.2.2 Schlachtung der Tiere und Gewinnung der Proben

Im Alter von 26 Wochen wurden 97 Wachteln zunächst gefangen und mittels Schlagholz betäubt. Anschließend wurden die Tiere in hierfür vorgesehenen Trichtern kopfüber fixiert und durch einen Kehlschnitt mit Eröffnung der großen Blutgefäße getötet. Es folgten das Eintauchen in ein ca. 60°C heißes Wasserbad und die Entfernung der Federn mit Hilfe einer Rupfmaschine sowie manuell. Die Schlachtkörper wurden ventral von der Kloake bis zum Brustbein eröffnet und ausgenommen. Hierbei wurden die gesamte Leber und eine ca. 4 g schwere Probe von stets der gleichen Lokalisation der tiefen Brustmuskulatur (*Musculus pectoralis. profundus*) sofort in eisgekühltes (ca. 2 – 4 °C) isotonisches Transportmedium gegeben und zur weiteren Bearbeitung in die Zentrale Biotechnische Betriebseinheit (ZBB) der Justus-Liebig-Universität Gießen überführt. Das Gehirn wurde im Ganzen entnommen und bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.



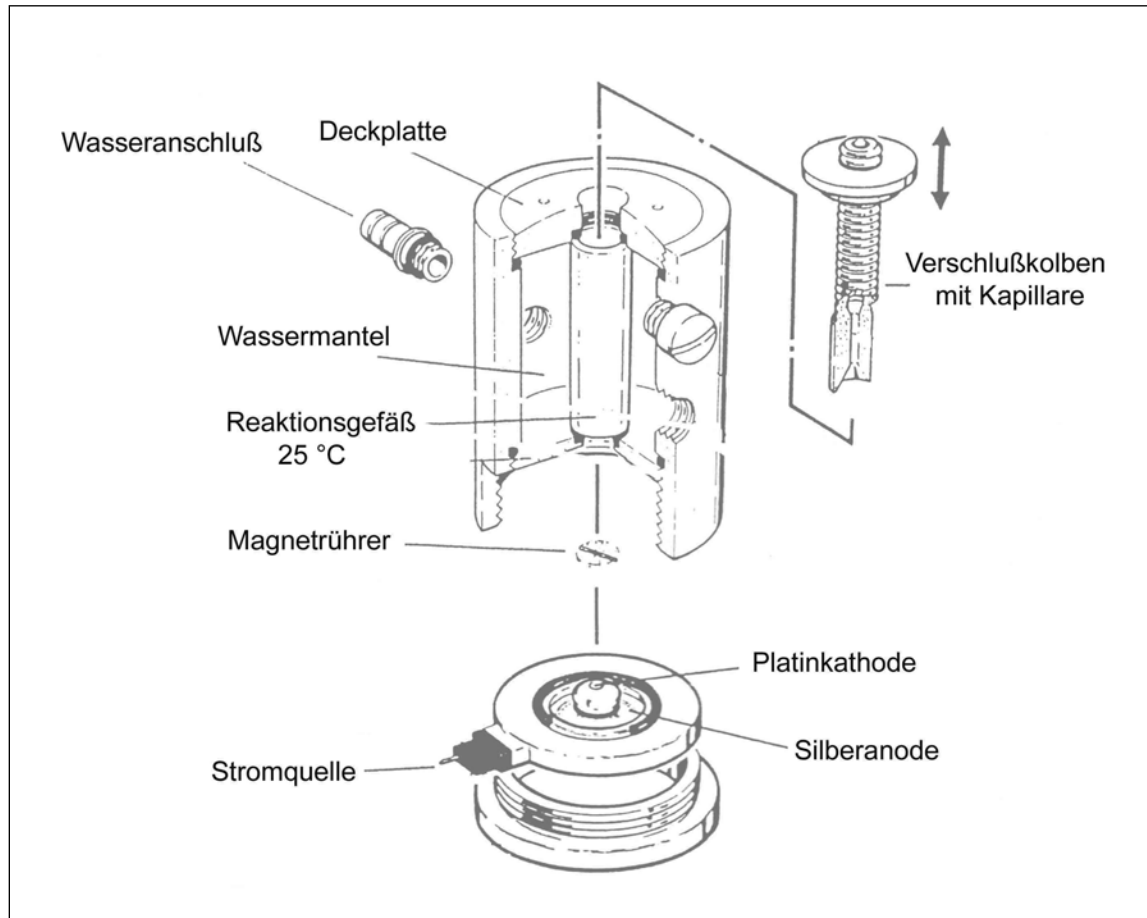
### 3.2.3 Bestimmung der mitochondrialen Atmungsaktivität

Die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien aus Leber und Pectoralismuskulatur wurde in getrennten Versuchsansätzen mit den Substraten Succinat bzw. Glutamat-Malat gemessen.

Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte nach einer modifizierten Methode von DZAPO und WASSMUTH (1973). 30 Minuten nach der Entnahme der Proben aus Leber und Pectoralismuskulatur fand die weitere Präparation in einem Kühlraum der ZBB bei 2 - 4° C statt. Von jeder Probe wurden zunächst sichtbare Blutreste, Fett- und Bindegewebe entfernt und eine definierte Menge (2,5 g der Leber- bzw. 3,5 g der Pectoralisprobe) in ein Becherglas mit Isolationsmedium eingewogen.

Das Probenmaterial wurde mit einer Schere vorzerkleinert und anschließend in einem Glas-Teflon-Homogenisator gepottet. Beim Homogenisieren ist darauf zu achten, dass sich der Glaskolben durch die Reibungswärme nicht zu stark erhitzt, da dies die freigesetzten Mitochondrien irreversibel schädigt. Um die Mitochondrienausbeute der Muskelprobenansätze zu erhöhen, wurde dem homogenisierten Muskelgewebe 1 mg Protease pro Gramm Frischgewebe zugesetzt und die Probe nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten erneut homogenisiert. Im Anschluss erfolgte die stufenweise Isolierung der freigesetzten Mitochondrien von den anderen Zellbestandteilen durch wiederholtes Zentrifugieren. Durch die Zentrifugation bei 4 °C und 1000 g über 10 Minuten wurden zunächst Zelltrümmer und Zellkerne entfernt. Der Überstand wurde dekantiert und im nachfolgenden Schritt 10 Minuten lang bei 7500 g zentrifugiert, woraufhin die Mitochondrien als Pellet sedimentierten. Der neue Überstand wurde verworfen, die Pellets je nach Gewebeherkunft in 2 ml (*Musculus pectoralis profundus*) bzw. 4 ml (Leber) Isolationsmedium resuspendiert und homogenisiert. Die so entstandene Mitochondriensuspension wurde bis zum nächsten Arbeitsschritt eiskühlt.

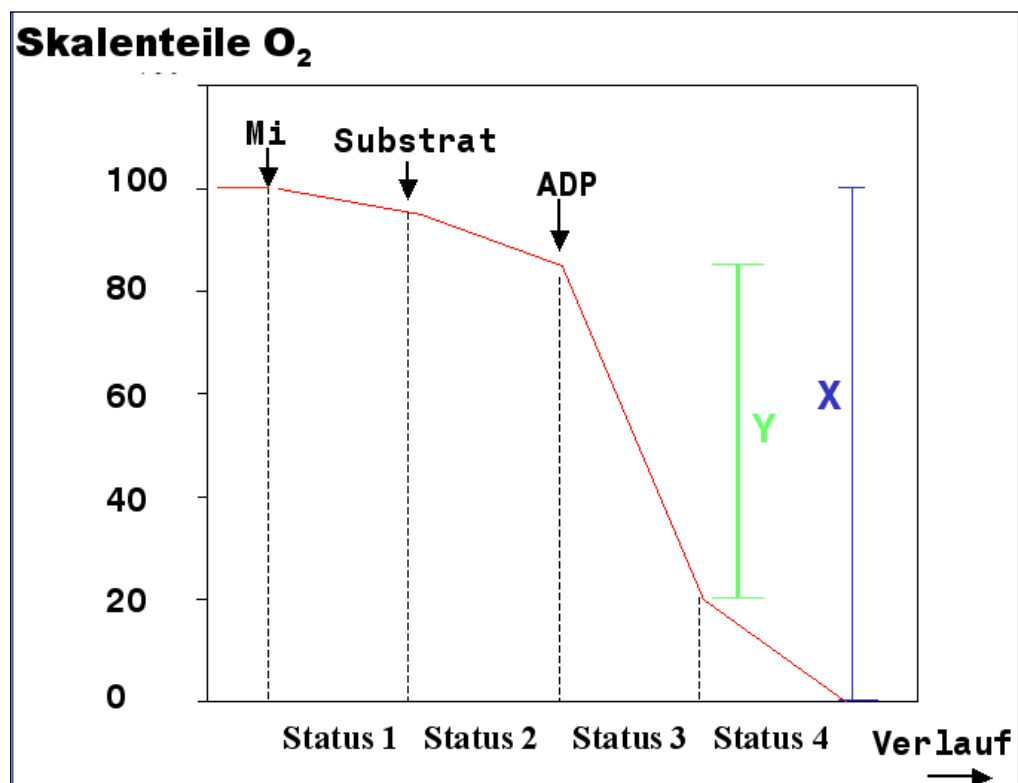
Wie schon bei der embryonalen Atmung fand eine Clarkzelle mit stationärer Platin-Silber-Elektrode Verwendung (Abb. 3-2). Die durch eine Teflonmembran geschützte Elektrode befand sich am Boden der doppelt ummantelten Messkammer, die bis auf eine Kapillare für die Zugabe von Substraten luftdicht verschlossen werden konnte, um den Eintritt von atmosphärischem Sauerstoff zu minimieren. In der Messkammer wurde durch Umspülen mit warmem Wasser eine konstante Inkubationstemperatur von 25 °C aufrecht erhalten. Während der Messungen sorgte ein Mikromagnetrührer für eine gleichmäßige Verteilung des Sauerstoffs im Reaktionsgemisch.



**Abb. 3-2:** Versuchsanordnung zur Messung der mitochondrialen Atmungsaktivität

Zunächst wurden 1,1 ml des auf 25 °C vortemperierten Inkubationsmediums in das Reaktionsgefäß einpipettiert und durch Bewegen mit dem Magnetrührer mit Luftsauerstoff abgesättigt. Nach dem Erreichen der Absättigung wurde der zu diesem Zeitpunkt gemessene Wert als Startpunkt der folgenden Reaktion definiert und die Messkammer verschlossen. Aus der Kombination von Leber- und Muskelmitochondrienproben mit Succinat bzw. Glutamat-Malat ergaben sich vier unterschiedliche Versuchsansätze. Die Messung und Erfassung der Veränderung des Sauerstoffgehaltes, ausgedrückt in Skalenteilen  $O_2$ , begann mit dem Einpipettieren von 100  $\mu$ l der Mitochondriensuspension und einer fünfminütigen Inkubationszeit der Mitochondrien. Diese Phase der Veratmung endogener Substrate wird als Status 1 bezeichnet (Chance und Williams, 1956). Mit der Zugabe von 50  $\mu$ l 5mM Succinat bzw. 50  $\mu$ l 5mM Glutamat-Malat als Substrat begann Status 2, gekennzeichnet durch einen Abfall der Sauerstoffkonzentration im Reaktionsmedium. Die Zugabe von 100  $\mu$ l 0,34 mM ADP als Phosphatakzeptor leitete die

Phase der aktiven Atmung der Mitochondrien (Status 3) mit hohem Sauerstoffverbrauch ein. Nach der vollständigen Phosphorylierung des zugesetzten ADP zu ATP erfolgte der Übergang zum kontrollierten Status 4 mit einem deutlichen Rückgang des Sauerstoffverbrauchs. Die Registrierung der Veränderungen im Sauerstoffgehalt im Inneren der Messkammer durch die Clarkelektrode und die Erfassung der Werte durch einen Kompensationsschreiber erfolgten analog zu den Messungen des embryonalen Sauerstoffverbrauchs. Abb. 3-3 ist an seine Aufzeichnungen angelehnt und zeigt schematisch den Verlauf des Sauerstoffgehaltes in der Clarkzelle, wobei X dem Gesamtsauerstoffgehalt in der Messkammer entspricht und Y dem Verbrauch im Status 3. Die Berechnung der mitochondrialen Atmungsaktivität für die verschiedenen Stadien erfolgte nach Estabrook (1967).



**Abb. 3-3:** Verlauf des Sauerstoffgehalts im Reaktionsgefäß in den vier Stadien der mitochondrialen Atmung mit Mi = Mitochondriensuspension; Y =  $\Delta S_{kt}$  im Status 3; X =  $\Delta S_{kt} O_2$  beim Start

Die Kurvenabschnitte konnten den jeweiligen Reaktionsstadien zugeordnet und aus den abgelesenen Werten der Sauerstoffverbrauch in  $\mu\text{Mol}$  für die Abschnitte 1 bis 4 berechnet werden. Der Sauerstoffverbrauch bezogen auf die Zeit wurde als Atmungsrate bezeichnet und in  $\mu\text{Mol/min}$  ausgedrückt.

Die Atmungsrate für den Status 3 berechnete sich wie folgt:

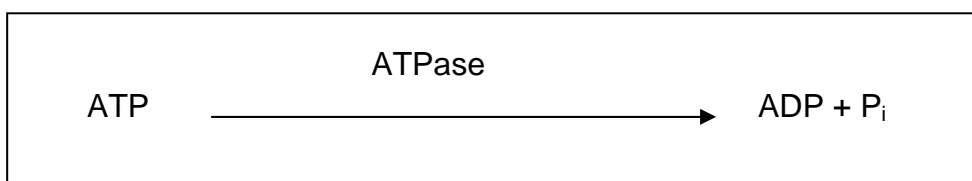
$$\frac{\text{O}_2 \text{ in } \mu\text{Mol}}{\text{min}} = [\text{O}_2] \text{ im Medium} \times \frac{\Delta\text{Skt im Status 3}}{\Delta\text{Skt O}_2 \text{ beim Start}} \times \frac{\text{ml Reaktionsgefäß}}{\text{min}}$$

Um die Werte der unterschiedlichen Tiere und Versuchsansätze miteinander vergleichen zu können, wurde diese Atmungsrate nun auf die Menge des im Reaktionsgemisch enthaltenen Mitochondrienproteins bezogen, wobei zur Vereinheitlichung auf die Rate pro Gramm Mitochondrienprotein umgerechnet wurde. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Suspension erfolgte zuvor mittels der Folin-Methode nach LOWRY et al. (1951). Als Standard diente Rinderserumalbumin. Weiterhin wurde der ADP/O-Quotient als Maß für die Effizienz der Atmungskette bestimmt, indem die Menge des zugesetzten ADP (170 nMol) auf die Gesamtmenge des im gesamten Status 3 veratmeten Sauerstoffs bezogen wurde (ESTABROOK, 1967). Schließlich ließ sich der Respiratorische Kontrollindex RCR berechnen, indem man den Quotienten aus der Atmungsrate im Status 3 (aktive Atmung) und der Atmungsrate im Status 4 (kontrollierte Atmung nach Verbrauch des ADP) bildete (Chance und Williams, 1956; Estabrook, 1967). Der RCR hat keine Maßeinheit und ist bei intakten Mitochondrien größer als 1.

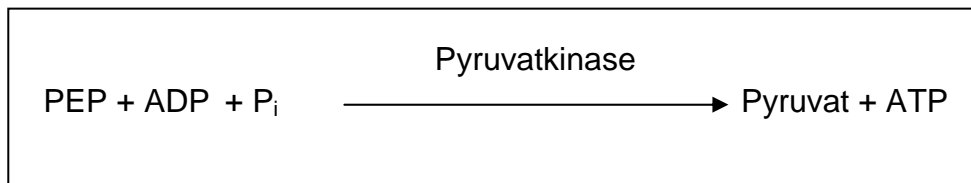
### 3.2.4 Bestimmung der Aktivität der ATPasen im Gehirn

Die Aktivitätsbestimmung der membrangebundenen Natrium-Kalium-ATPase sowie der Mg-ATPase erfolgte nach SCHARSCHMIDT et al. (1979). Im folgenden werden die dieser Methode zugrundeliegenden Reaktionsschritte dargestellt:

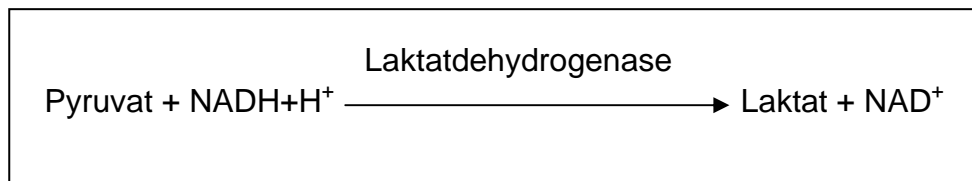
Die ATPase spaltet das ATP in ADP und einen Phosphatrest P<sub>i</sub>



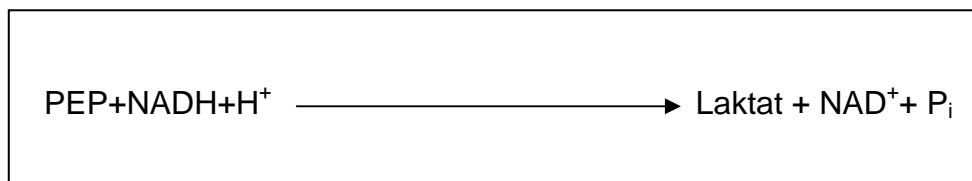
Die Pyruvatkinase PK katalysiert die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat; die hierbei freiwerdende Energie dient zur Umwandlung von ADP in ATP.



Das hieraus entstehende Pyruvat wird unter Oxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  zu Laktat umgewandelt.



Die Summengleichung der drei Einzelschritte sieht wie folgt aus:



Zur Herstellung der Gehirnmembranpräparation wurde das tiefgefrorene Gehirn zunächst in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut; alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. 1 gr des Organs wurde mit einer Schere vorzerkleinert und in 10 ml Medium in einem Glas-Teflon-Homogenisator in acht Schritten gepottert. Das entstandene Homogenisat wurde gefiltert und unverdünnt verwendet.

Die Stammlösungen der Reaktionspuffer 1 (mit Ouabain) und 2 (ohne Ouabain) und die ATP-Lösung waren vorbereitet und wurden auf Eis aufbewahrt. 0,945 ml des auf 37 °C vortemperierten Reaktionspuffers 1 bzw. 2 wurden mit je 0,025 ml der 200 mM ATP-Lösung und 0,01 ml Enzymlösung (1000 U/ml LDH, 1000 U/ml PK) in einer beheizbaren 1 ml-Küvette gemischt und 3 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch das Hinzufügen der bis dahin auf Eis aufbewahrten Gehirnmembranpräparation mit anschließendem Mischen. Während des Ablaufs der Reaktion wurde die Extinktion des Gemischs in einem Spektrometer bei 340 nm und 37 °C über einen Zeitraum von fünf

Minuten alle sechs Sekunden gemessen. Die Extinktion des gleichen Gemischs ohne Zugabe der ATP-Lösung wurde zur Definition des Leerwertes herangezogen.

Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem Soft-Pac-Programmeinschub Kinetics (*Beckman-Coulter, Krefeld*). Aus den linearen Extinktionsänderungen wurde mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von NADH und der jeweiligen Proteinkonzentration die Enzymaktivität in  $\mu\text{mol}$  freigesetzten  $\text{P(i)}$  pro  $\text{mg}$  Protein und Stunde errechnet. Im Versuchsansatz ohne Ouabain waren beide ATPasen aktiv. Im Versuchsansatz mit Ouabain war die ouabainsensitive Na-K-ATPase gehemmt, so dass die gemessene Aktivität lediglich der Mg-ATPase entsprach. Die Differenz der beiden Ansätze entsprach der Na-K-ATPase-Aktivität.

### **3.3 Statistische Auswertung:**

Mittels Chi-Quadrat-Test wurden die Verlust- und Schlupfraten zwischen den Wachtellinien und den Durchgängen auf Unterschiede überprüft. Für die statistische Auswertung wurde das Programm „Statistical Package for the Social Science“ (SPSS) für Windows Version 10.0 genutzt. Mit Hilfe dieser Software wurde die deskriptive Statistik, der Test auf Normalverteilung nach KOLMOGOROV-SMIRNOV (1997), PEARSONSCHE Korrelationsberechnungen und eine Varianzanalyse durchgeführt. Es wurden zwei statistische Modelle zugrunde gelegt, um fixe Effekte und Kovariablen im Hinblick auf die untersuchten Merkmale schätzen zu können.

## Modell 1:

$$O_2_{ijkl} = \mu + \text{Durchgang } i + \text{Linie } j + \text{Verbleib } k + \text{KOV (EFM}_{ijkl}) + e_{ijkl}$$

$O_2_{ijkl}$	$O_2$ -Verbrauch in ml am 7. bzw. 12. Bruttag des Wachtelembryos l
M	Mittelwert
Durchgang i	fixer Einfluss des Durchgangs i auf den $O_2$ -Verbrauch des Wachtelembryos l (i = 1 - 3)
Linie j	fixer Einfluss der Linie j auf den $O_2$ -Verbrauch des Wachtelembryos l (j = 1 - 3)
Verbleib k	fixer Einfluss des Verbleibs k auf den $O_2$ -Verbrauch des Wachtelembryos l (k = 1 - 3)
KOV (EFM <sub>ijkl</sub> )b	linearer Einfluss der Eifrischmasse auf den $O_2$ -Verbrauch des Wachtelembryos l
EFM <sub>ijkl</sub>	Eifrischmasse des Wachtelembryos l
$e_{ijkl}$	zufällige Restkomponente

## Modell 2:

$$O_2_{ijk} = \mu + \text{Linie } i + \text{Versuchstag } j + e_{ijk}$$

$O_2_{ijk}$	$O_2$ -Verbrauch in ml der Leber- bzw. Pectoralismatchondrien von Tier k
M	Mittelwert
Linie i	fixer Einfluss der Linie i auf den $O_2$ -Verbrauch der Mitochondrien von Tier k (i = 1 - 3)
Versuchstag j	fixer Einfluss des Versuchstages j auf den $O_2$ -Verbrauch der Mitochondrien von Tier k (j = 1 - 7)
$e_{ijk}$	zufällige Restkomponente

## **4 Untersuchungsergebnisse**

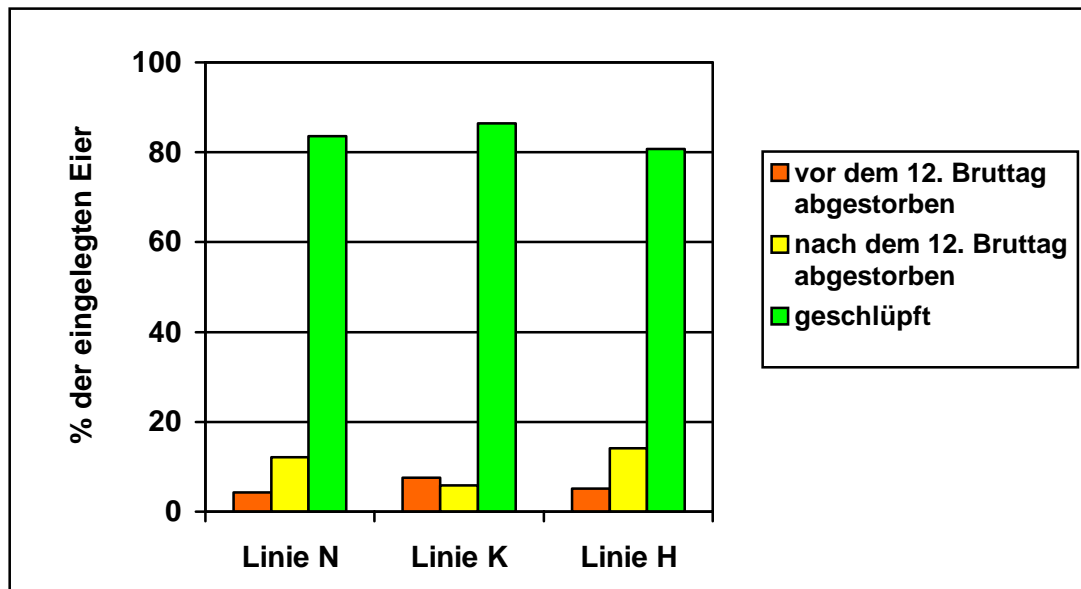
### **4.1 Überlebensrate und Schlupffähigkeit**

369 befruchtete Bruteier mit einem durchschnittlichen Eigewicht von 10,2 g am Tag der Einlage wurden bebrütet. Daraus schlüpften 308 Küken, was einer Schlupfrate von 83,5 % entspricht. 61 Embryonen starben während der Brutzeit ab (16,5 %), davon 21 (5,7 %) vor der Messung am 12. Bruttag. Die restlichen 40 Embryonen (10,8 %) starben nach dem 12. Bruttag bis einschließlich beim Schlupf (sog. „Steckenbleiber“). Für die statistische Auswertung der Varianzursachen im embryonalem Sauerstoffverbrauch am 7. Bruttag wurden diese unterschiedlichen Zeiträume (vor und nach dem 12. Bruttag) des Absterbens zusätzlich berücksichtigt.

#### **4.1.1 Brutergebnis unter Berücksichtigung der Linien und des Durchgangs**

In Abb. 4-1 sind die Verlustraten in den verschiedenen Zeiträumen der Brut und die Schlupfrate für die drei verschiedenen Linien dargestellt. Mittels Chi-Quadrat-Test ( $P = 0,1 \%$ ) wurden keine Abweichungen in den beobachteten und den erwarteten Verlust- (vor und nach dem 12. Bruttag) und Schlupfraten zwischen den drei Wachtellinien festgestellt. Jedoch wurden Unterschiede in den Verlust- bzw. Schlupfraten zwischen den einzelnen Brutdurchgängen beobachtet. Hierbei wurde im 3. Durchgang eine sehr geringe Absterberate vor dem 12. Bruttag verzeichnet, insgesamt waren die embryonalen Verluste (9,2 %) in diesem Brutdurchgang prozentual niedriger im Vergleich zur 1. (14,5 %) und zur 2. Einlage (49 %).





**Abb. 4-1:** Verlust- (vor und nach dem 12. Bruttag) und Schlupfraten unter Berücksichtigung der Linien

## 4.2 Embryonaler Sauerstoffverbrauch

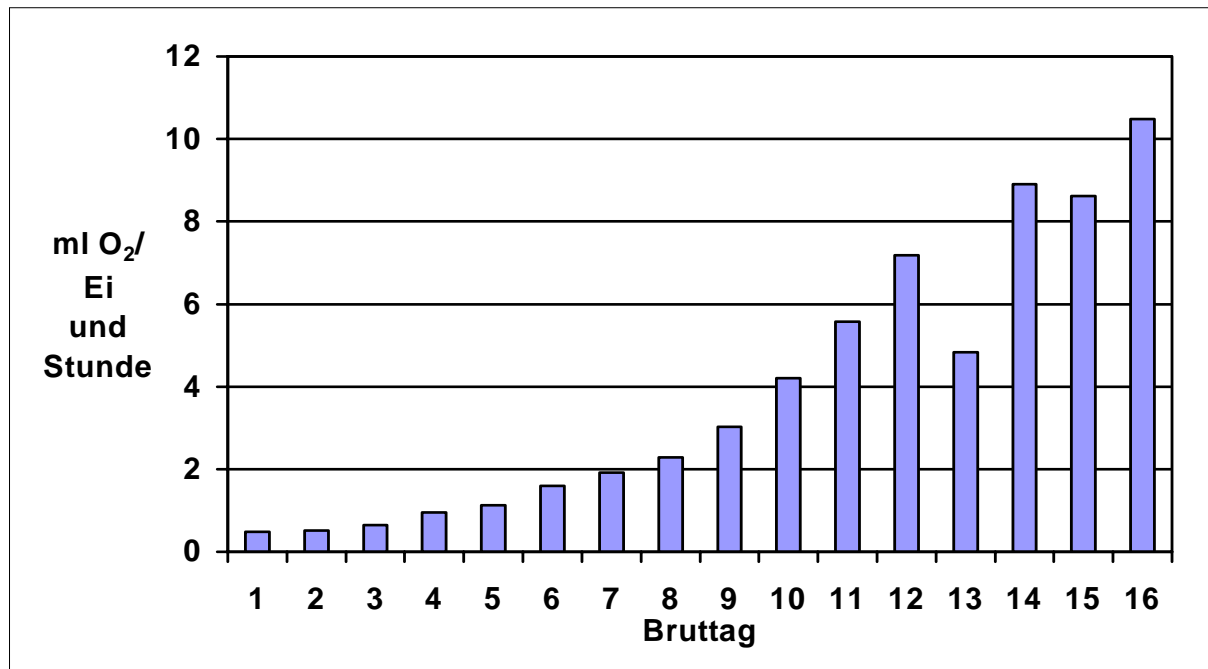
### 4.2.1 Verlauf des embryonalen Sauerstoffverbrauchs

In einem Vorversuch an 30 Eiern wurde der embryonale Sauerstoffverbrauch an jedem Tag der Brut bestimmt. In Tab. 4-1 sind die durchschnittlichen Sauerstoffverbrauchswerte über den gesamten Brutzeitraum angegeben.

**Tab. 4-1:** Durchschnittlicher täglicher Sauerstoffverbrauch im Brutverlauf in ml O<sub>2</sub>/Ei und Stunde abhängig von der Linie

	ml O <sub>2</sub> /Ei und Stunde			
Brutttag	Linie N	Linie K	Linie H	gesamt
Anzahl untersuchter Eier	9	12	9	30
1	0,44	0,44	0,6	0,49
2	0,53	0,5	0,51	0,51
3	0,61	0,65	0,68	0,65
4	0,93	0,97	0,93	0,95
5	1,08	1,23	1,03	1,12
6	1,59	1,74	1,44	1,6
7	1,82	2,01	1,89	1,92
8	2,25	2,42	2,14	2,29
9	3,0	3,19	2,83	3,02
10	4,58	4,29	3,69	4,2
11	5,48	6,10	4,99	5,58
12	6,81	7,46	7,19	7,19
13	4,63	4,80	5,08	4,83
14	8,73	8,89	9,09	8,90
15	8,53	8,82	8,46	8,62
16	9,74	10,59	11,1	10,49

Eine stete Steigerung der Atmungsaktivität der Wachtelembryonen konnte bis zum 12. Brutttag beobachtet werden (Abb. 4-2). Am 13. Brutttag war ein erheblicher Rückgang im Sauerstoffverbrauch zu verzeichnen. Anschließend stieg der gemessene Sauerstoffverbrauch wieder an mit einem Plateau am 15. Brutttag.

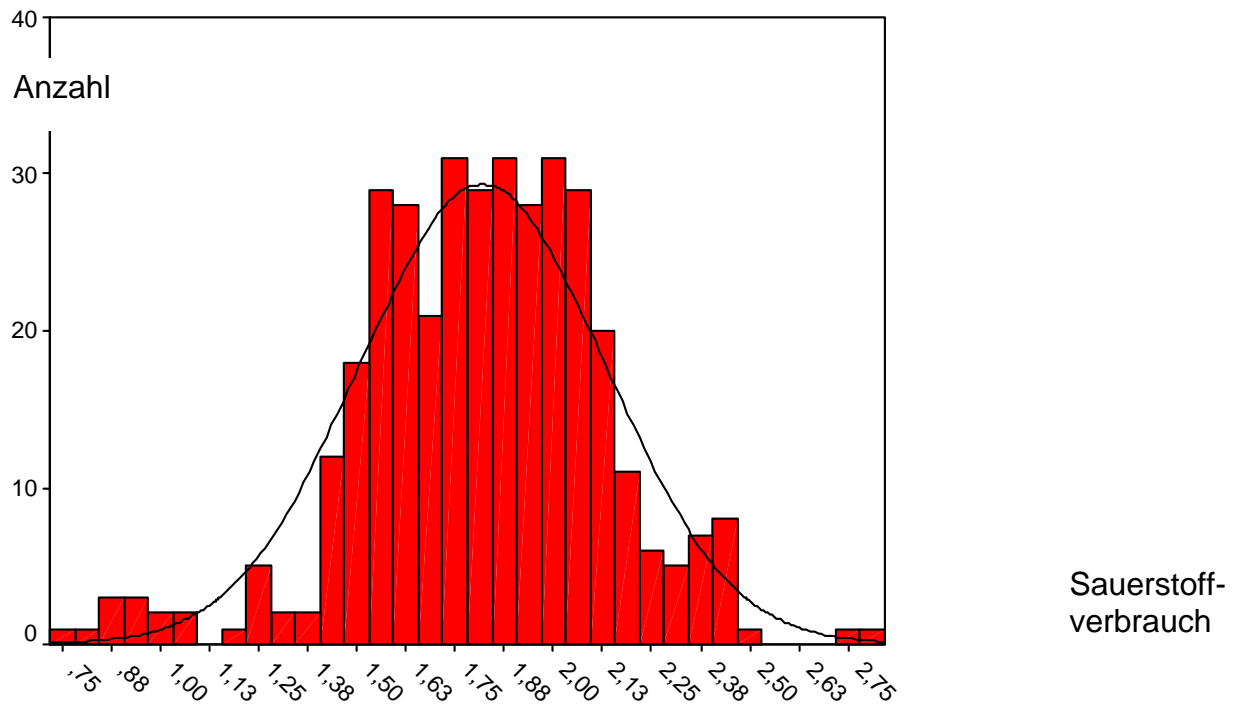


**Abb. 4-2:** Durchschnittlicher täglicher Sauerstoffverbrauch im Brutverlauf in ml O<sub>2</sub>/Ei und Stunde

Aus diesen Werten errechnet sich ein Sauerstoffbedarf von 1496 ml für die gesamte Brutzeit; dies entspricht ca. 150 ml O<sub>2</sub>/gr Eifrischmasse. Aufgrund des Verlaufs wurden für den Hauptversuch der 7. und 12. Bruttage als Messtage für die embryonale Atmungsaktivität festgelegt.

#### 4.2.2 Embryonaler Sauerstoffverbrauch am 7. Bruttage

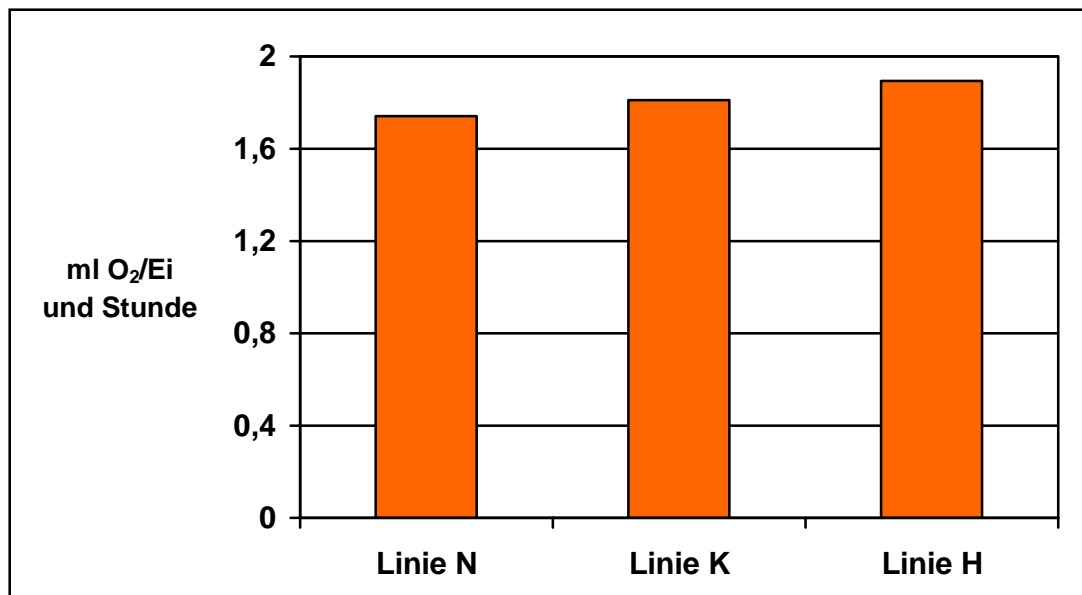
An 369 Bruteiern wurde der Sauerstoffverbrauch am 7. Bruttage ermittelt. Durchschnittlich wurden  $1,82 \pm 0,31$  ml O<sub>2</sub>/Ei und Stunde verbraucht. Wie im Histogramm (Abb. 4-3) gezeigt wird, sind die Werte normal verteilt.



**Abb. 4-3:** Histogramm mit Normalverteilungskurve für den Sauerstoffverbrauch am 7. Brutttag

#### 4.2.2.1 Linienunterschiede in der Atmungsaktivität am 7. Brutttag

Die Embryonen der Linie H wiesen den höchsten Mittelwert für die Atmungsaktivität am 7. Brutttag auf ( $1,89 \pm 0,28$  ml O<sub>2</sub>/Ei und Stunde; Abb. 4-4), die der Linie N den niedrigsten ( $1,74 \pm 0,30$  ml O<sub>2</sub>/Ei und Stunde), der Mittelwert der Kontrollgruppe lag dazwischen ( $1,81 \pm 0,34$  ml O<sub>2</sub>/Ei und Stunde). Die auf hohe Staubbadeaktivität selektierte Linie H unterschied sich signifikant von der Kontrolllinie ( $P = 0,037$ ) und hochsignifikant von der Linie N ( $P = 0,000$ ). Der Unterschied in der mittleren Atmungsaktivität der Linie N und der Linie K konnte statistisch nicht abgesichert werden ( $P = 0,09$ ).



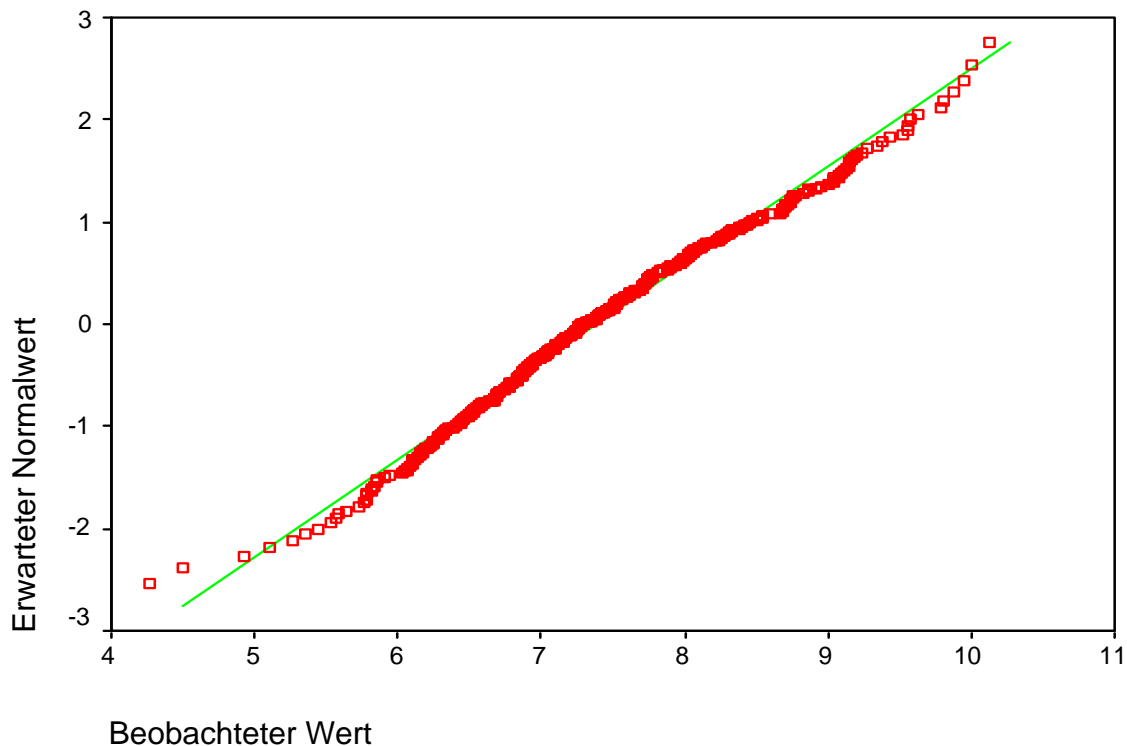
**Abb. 4-4:** Embryonaler Sauerstoffverbrauch am 7. Bruttag im Vergleich der Linien N, K, H

#### **4.2.2.2 Unterschiede in der Atmungsaktivität am 7. Bruttag zwischen unterschiedlich vitalen Embryonen und zwischen den Brutdurchgängen**

Bei der Messung am 7. Bruttag war die durchschnittliche Atmungsaktivität der Tiere, die noch vor der folgenden Messung absterben sollten, am niedrigsten. Den höchsten Sauerstoffverbrauch wiesen die normal schlupffähigen Embryonen auf. Die Gruppe der Bruteier, die zwischen dem 12. Bruttag und dem Schlupf abstarben, lag dazwischen. Die vor dem 12. Bruttag abgestorbenen Embryonen hatten einen signifikant niedrigeren ( $P = 0,003$ ) mittleren Sauerstoffverbrauch als die zwischen Tag 12 und dem Schlupf Verstorbenen, und lagen hochsignifikant ( $P = 0,000$ ) unter den schlupffähigen Tieren. Zwischen den nach dem 12. Bruttag abgestorbenen Embryonen und den zum Schlupf gekommenen Tieren konnte am 7. Bruttag nur ein tendenzieller Unterschied ( $P = 0,052$ ) beobachtet werden.

### 4.2.3 Embryonaler Sauerstoffverbrauch am 12. Bruttag

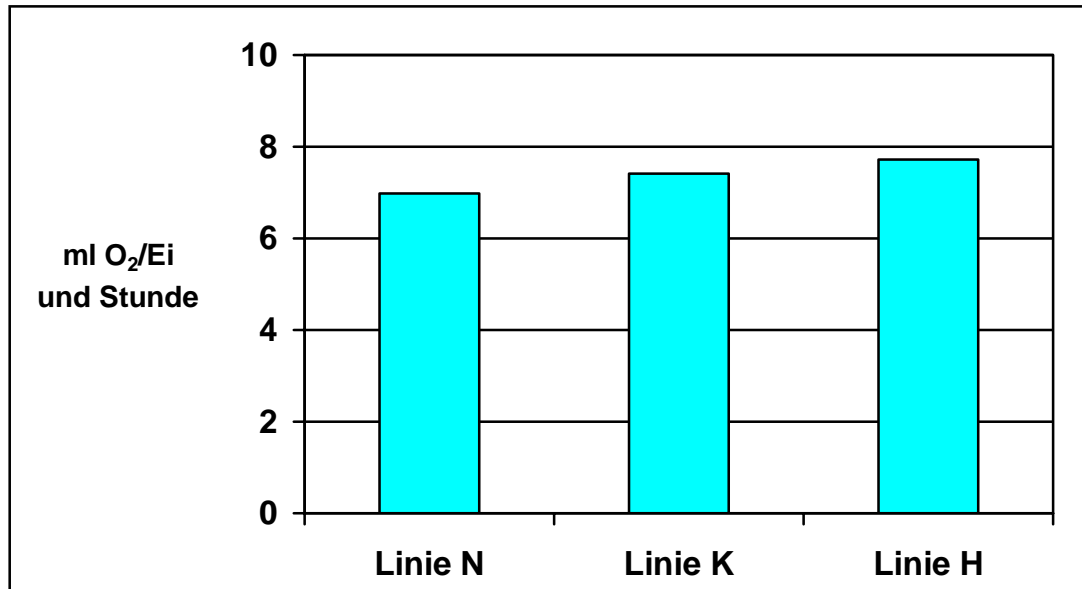
Am 12. Bruttag wurde die embryonale Atmung an den verbliebenen intakten Bruteiern ( $n = 348$ ) wiederholt. Hierbei konnte ein durchschnittlicher Sauerstoffverbrauch von  $7,39 \pm 1,05$  ml  $O_2$ /Ei und Stunde gemessen werden. Die Werte sind um den Mittelwert normal verteilt (Abb. 4-5).



**Abb. 4-5:** Q-Q Diagramm für  $O_2$ -Verbrauch am 12. Bruttag

#### 4.2.3.1 Linienunterschiede in der Atmungsaktivität am 12. Bruttag

In Abb. 4-6 wird aufgezeigt, dass die Linie H wie am 7. Bruttag auch am 12. Bruttag den höchsten embryonalen Sauerstoffverbrauch von  $7,72 \pm 1,16$  ml  $O_2$ /Ei und Stunde aufwies. Embryonen der Linie N hatten am 12. Bruttag den niedrigsten Verbrauch ( $6,97 \pm 0,94$  ml  $O_2$ /Ei und Stunde), der Sauerstoffverbrauch der Kontrolllinie lag zwischen mit  $7,41 \pm 0,84$  ml  $O_2$ /Ei und Stunde zwischen den beiden anderen Linien. Bruteier der Linie N unterschieden sich in ihrer Atmungsaktivität hochsignifikant von den Linien K und H (jeweils  $P = 0,000$ ), die Unterschiede im embryonalen Sauerstoffverbrauch der Linien K und H konnten gleichfalls statistisch abgesichert werden ( $P = 0,018$ ).



**Abb. 4-6:** Embryonale Atmung am 12. Bruttage im Vergleich der Linien N, K, H

#### **4.2.3.2 Unterschiede in der Atmungsaktivität am 12. Bruttage zwischen unterschiedlich vitalen Embryonen und zwischen den Brutdurchgängen**

Die vor dem Schlupf abgestorbenen Embryonen differierten im Sauerstoffverbrauch am 12. Bruttage signifikant ( $P = 0,03$ ) von den Schlupffähigen. Der Unterschied in der Atmungsaktivität zwischen den Brutdurchgängen 2 und 3 war hochsignifikant ( $P = 0,006$ ); die Durchgänge 1 und 2 bzw. 1 und 3 unterschieden sich im Mittelwert nicht signifikant.

#### **4.2.3.3 Einflussfaktoren auf die Varianz in der embryonalen Atmungsaktivität am 7. und am 12. Bruttage**

Die Varianz im embryonalen Sauerstoffverbrauch konnte anhand der berücksichtigten Einflussfaktoren zu 20,6 % für den 7. Bruttage und zu 16,3 % für den 12. Bruttage erklärt werden (Tab. 4-2). Der Faktor „Linie“ hatte an beiden Bruttagen einen hochsignifikanten Einfluß auf die embryonale Atmung. Der Versuchsdurchgang und das Eigewicht wirkten sich ebenfalls signifikant bis hochsignifikant auf beide Messungsergebnisse aus. Der Einfluß der Vitalität war am 7. Bruttage noch deutlich statistisch abgesichert, am 12. Bruttage nur noch

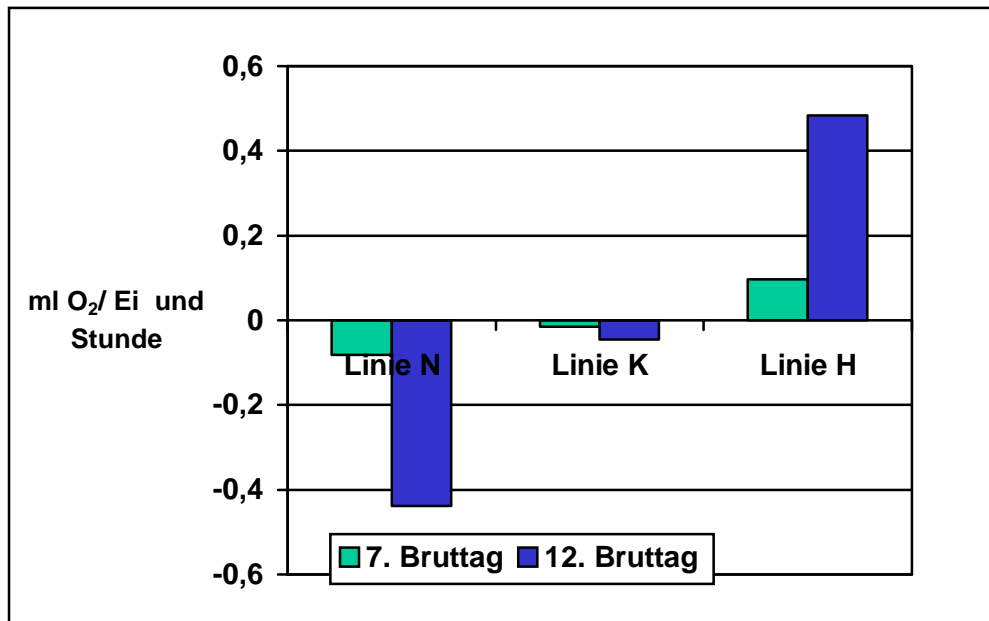
tendenziell ( $P = 0,06$ ). Die durchschnittlich höher gemessenen Sauerstoffverbrauchswerte für schwerere Eier im Vergleich zu leichteren Eiern konnten statistisch abgesichert werden.

**Tab. 4-2:** Randmitteleffekte und Signifikanzniveaus von Einflussfaktoren auf den Sauerstoffverbrauch von Embryonen am 7. und 12. Bruttag unter Angabe der Stichprobengröße, des wahren Mittelwertes und der erklärten Varianz.

		ml O <sub>2</sub> / Ei und Stunde	
Messzeitpunkt		7. Bruttag	12. Bruttag
Anzahl untersuchte Bruteier		369	348
wahrer Mittelwert		1,653	7,192
fixe Effekte:			
Linie:	N	-0,081 ***	-0,439 ***
	K	-0,015 ***	-0,046 ***
	H	+0,097 ***	+0,484 ***
Durchgang:	1	+0,046 ***	+0,067 **
	2	+0,030 ***	-0,265 **
	3	-0,075 ***	+0,197 **
Vitalität:	abgst. vor dem 12. Bruttag	-0,307 ***	
	abgst. nach dem 12. Bruttag	+0,095 ***	-0,159 n.s.
	geschlüpft	+0,21 3***	+0,158 n.s.
Kovariablen:			
Eifrischmasse		0,039 *	0,237 ***
% erklärte Varianz		20,6	16,3

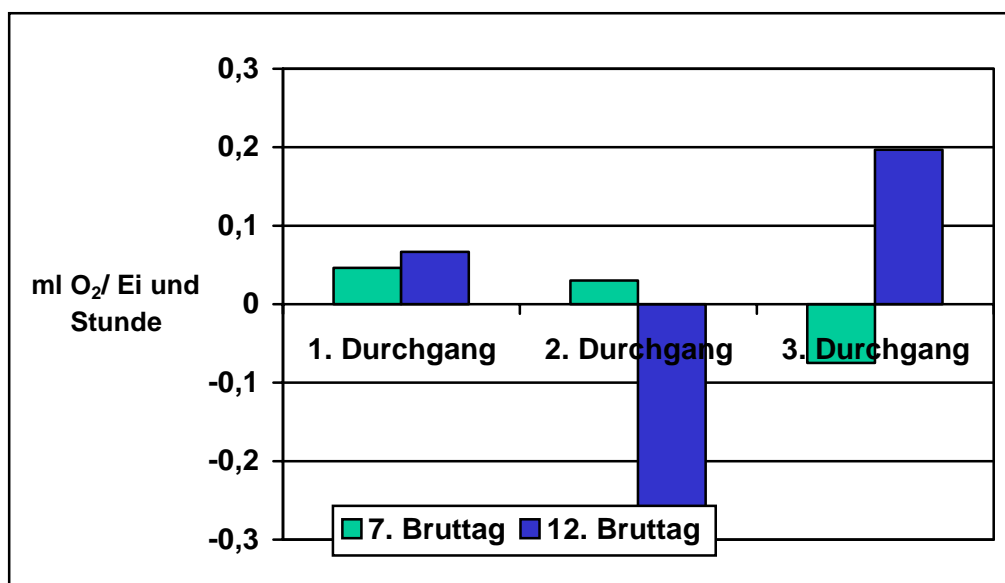
Die Linie hatte einen hochsignifikanten Einfluss auf den embryonalen Sauerstoffverbrauch. Am 7. Bruttag war die Atmungsrate der selektierten Linie H denen der Linie N und K hochsignifikant überlegen (Abb. 4-7). Der Unterschied im Sauerstoffverbrauch am 7. Bruttag konnte jedoch nicht für die Linien N und K ( $P = 0,081$ ) statistisch abgesichert werden. Am 12. Bruttag konnte die hochsignifikante Überlegenheit im Sauerstoffverbrauch der Linie H über die anderen Linien weiterhin beobachtet werden. Zudem konnte zu diesem späteren Zeitpunkt auch ein hochsignifikanter Unterschied ( $P = 0,004$ ) zwischen der Linie N und K festgestellt werden.





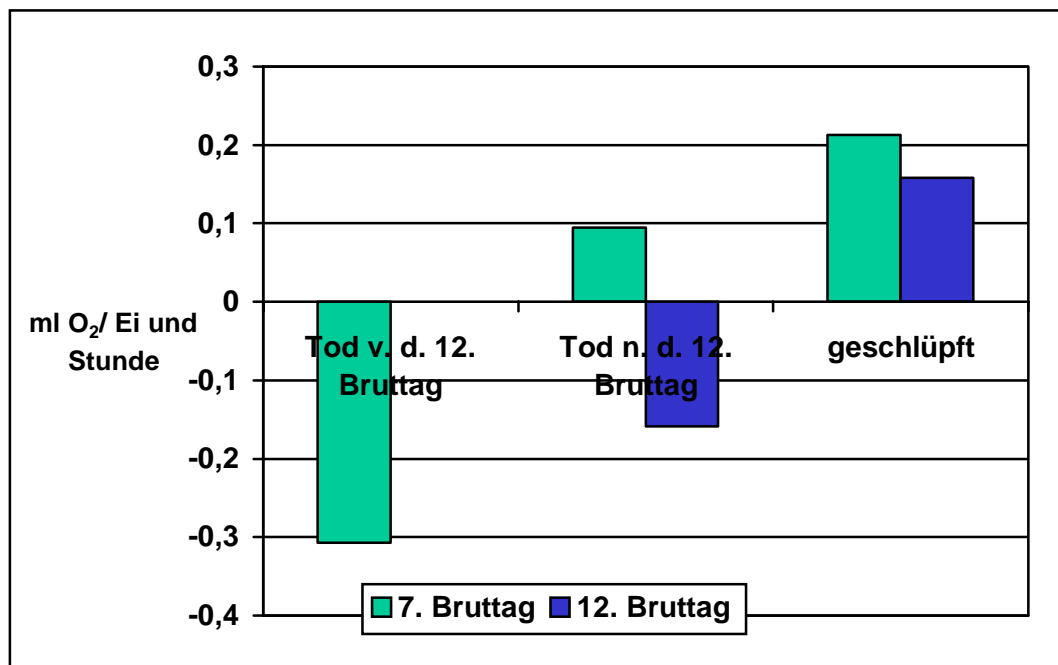
**Abb. 4-7:** Abweichungen im embryonalen Sauerstoffverbrauch am 7. und am 12. Brutttag vom wahren Mittelwert in Abhängigkeit von der Linie

Die gemessenen Sauerstoffverbrauchswerte vom 3. Durchgang am 7. Brutttag ( $P_{\text{Durchgang1} \neq \text{Durchgang3}} = 0,000$ ,  $P_{\text{Durchgang2} \neq \text{Durchgang3}} = 0,007$ ) und vom 2. Durchgang am 12. Brutttag ( $P_{\text{Durchgang1} \neq \text{Durchgang2}} = 0,024$ ,  $P_{\text{Durchgang2} \neq \text{Durchgang3}} = 0,001$ ) fielen niedriger aus im Vergleich zu den anderen Durchgängen an den betreffenden Messtagen aus (Abb. 4-8). Am 7. Brutttag unterschied sich der 1. Durchgang nicht vom 2. Durchgang bzw. am 12. Brutttag der 1. Durchgang nicht vom 3. Durchgang.



**Abb. 4-8:** Abweichungen im embryonalen Sauerstoffverbrauch am 7. und am 12. Brutttag vom wahren Mittelwert in Abhängigkeit vom Versuchsdurchgang

Der Sauerstoffverbrauch frühzeitig abgestorbener Embryonen (vor dem 12. Brutttag) unterschied sich bereits bei der Messung am 7. Brutttag hochsignifikant von den später abgestorbenen ( $P = 0,000$ ) und den ausgeschlüpften Tieren ( $P = 0,000$ ). Die erst nach der zweiten Messung verstorbenen Embryonen differierten zum ersten Messtermin bereits signifikant ( $P = 0,016$ ) von den ausgeschlüpften Tieren. Diese sich im Sauerstoffverbrauch widerspiegelnde Vitalitätsunterschiede konnten auch am 12. Brutttag beobachtet werden (Abb. 4-9). Bruteier, bei denen es zu keinem Schlupf kam, hatten eine niedrigere Atmungsrate im Vergleich zu denen, aus denen Küken schlüpften. Dieser Unterschied konnte statistisch jedoch nicht abgesichert werden, da er mit  $P = 0,06$  an der Signifikanzgrenze lag.



**Abb. 4-9:** Abweichungen im embryonalen Sauerstoffverbrauch am 7. und am 12. Brutttag vom wahren Mittelwert in Abhängigkeit von der Vitalität

### 4.3 Mitochondriale Atmungsaktivität

Die Mitochondriale Atmungsaktivität in Gewebeproben von Leber und tiefem Pectoralmuskel wurde an insgesamt 97 Tieren bestimmt.

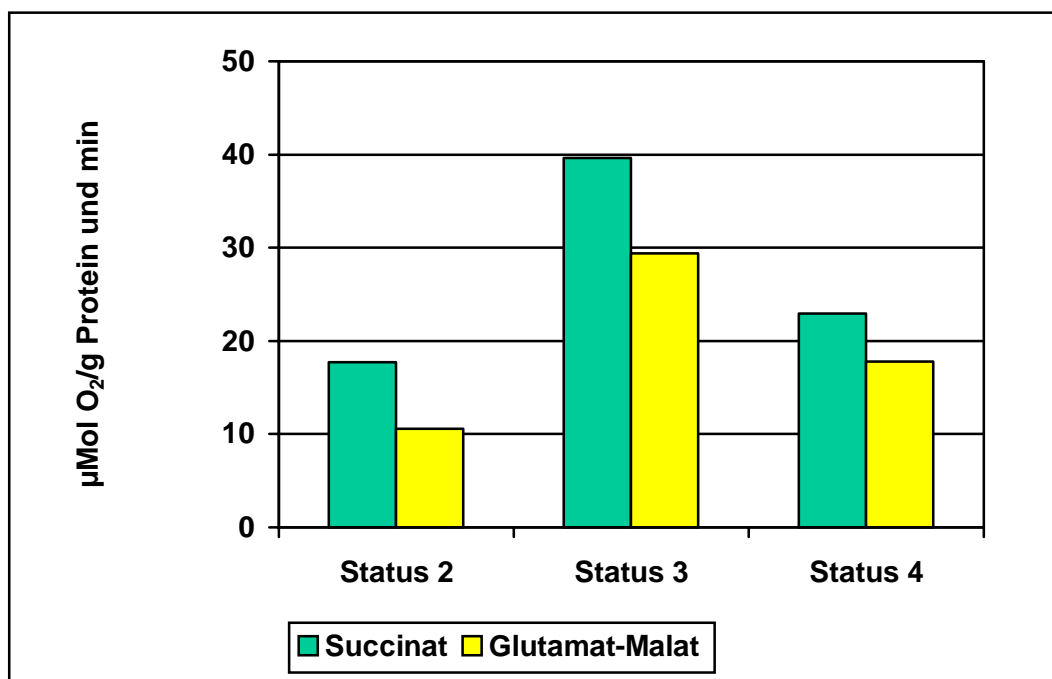
Zur Messung des mitochondrialen Energiestoffwechsels wurden für jede Gewebeart jeweils zwei Versuchsansätze mit den Substraten aus der Atmungskette, Succinat bzw. Glutamat-Malat, durchgeführt.

#### 4.3.1 Proteingehalt der Mitochondriensuspension von Leber bzw. Pectoralmuskel

Der mittlere Proteingehalt der aus 2,5 g Leber gewonnenen 4 ml Mitochondriensuspension betrug  $14,91 \pm 3,18$  mg/ml. Aus 3,5 g *M. pectoralis profundus* entstanden 2 ml Mitochondriensuspension mit einem durchschnittlichen Proteingehalt von  $3,68 \pm 1,35$  mg/ml.

#### 4.3.2 Atmungsaktivität der Lebermitochondrien

Unter Verwendung des Substrates Succinat betrug die durchschnittliche Atmungsaktivität der Lebermitochondrien im Status 2  $17,70 \pm 4,81$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$ , beim Einsatz des Substrates Glutamat-Malat waren es  $10,59 \pm 3,33$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  (Abb. 4-10). Im voll aktivierten Status 3 der mitochondrialen Atmung betrug der Sauerstoffverbrauch der Lebermitochondrien mit dem Substrat Succinat  $39,64 \pm 11,97$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  und mit dem Substrat Glutamat-Malat  $29,41 \pm 10,29$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$ . Im Status 4 lag die mittlere Atmungsrate der Lebermitochondrien bei  $22,95 \pm 6,24$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  für das Substrat Succinat und bei  $17,82 \pm 5,86$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  für das Substrat Glutamat-Malat.



**Abb. 4-10:** Durchschnittliche Atmungsaktivität der Lebermitochondrien in den Stadien 2, 3 und 4

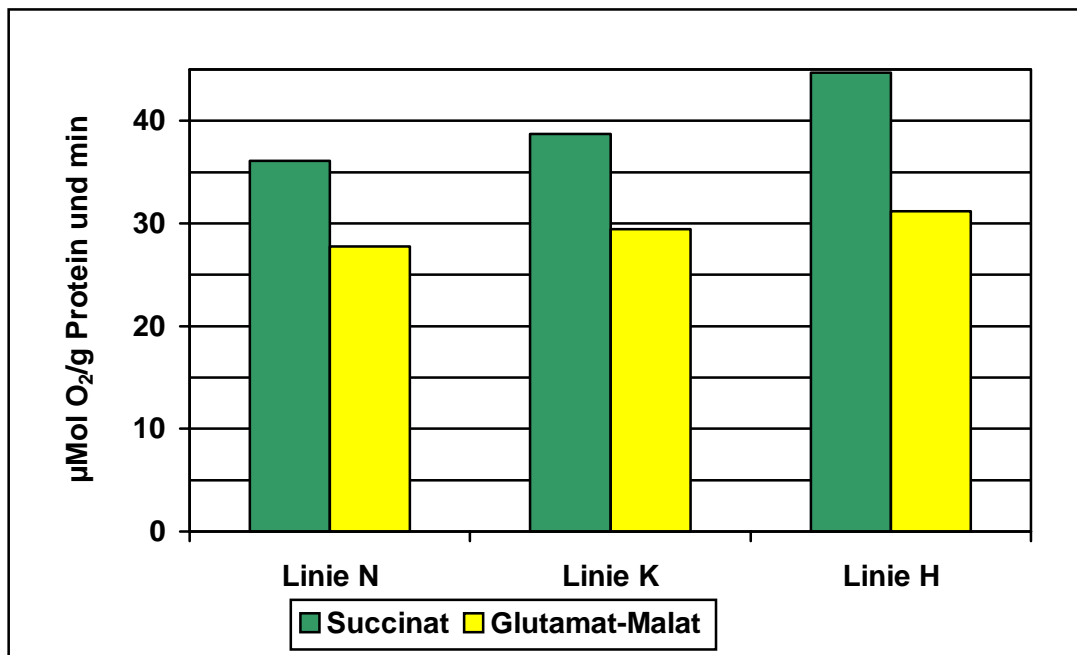
#### 4.3.2.1 Linienunterschiede in der Atmungsrate des Status 3 der Lebermitochondrien

In Tab. 4-3 ist der Anstieg der für beide Versuchsansätze getrennt nach Linie ausgewerteten Atmungsraten von der Linie N über die Linie K zur Linie H zu sehen.

**Tab. 4-3:** Linienunterschiede im durchschnittlicher Sauerstoffverbrauch der Lebermitochondrien im Status 3 unter Verwendung der Substrate Succinat und Glutamat-Malat unter Angabe der Standardabweichung und der Probenanzahl

Sauerstoffverbrauch im Status 3			
Linie	in $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$		
	n	Substrat Succinat	Substrat Glutamat-Malat
N	34	$36,12 \pm 13,64$	$27,78 \pm 10,09$
K	33	$38,69 \pm 7,75$	$29,47 \pm 10,39$
H	30	$44,69 \pm 12,45$	$31,19 \pm 10,47$
Gesamt	97	$39,64 \pm 11,97$	$29,41 \pm 10,29$

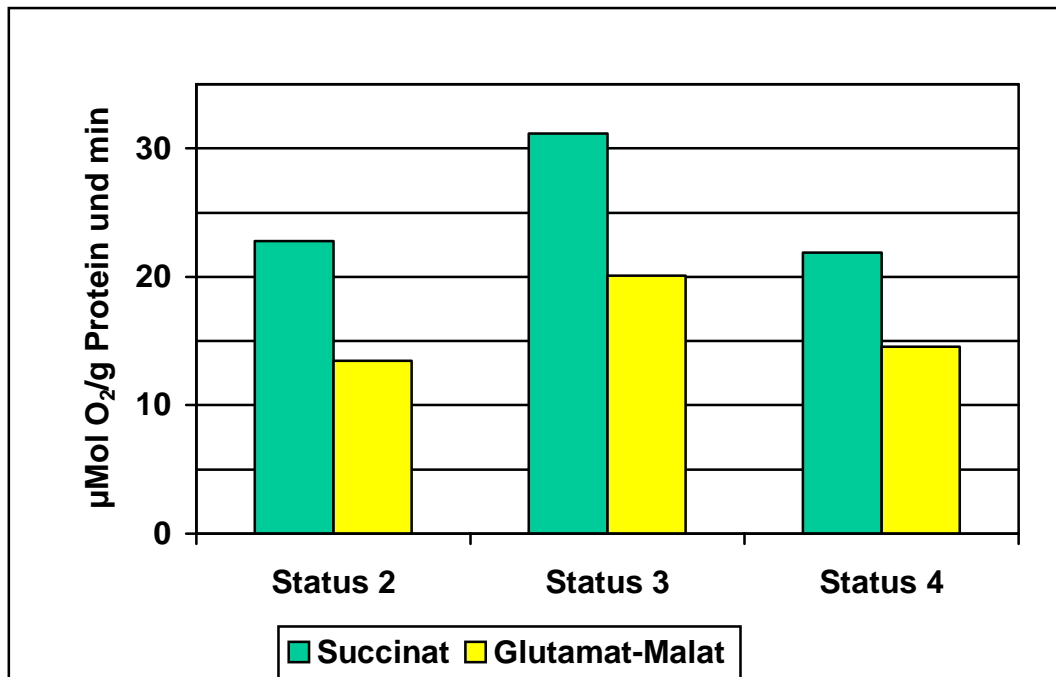
Im Versuchsansatz mit dem Substrat Succinat unterschied sich die mitochondriale Atmungsrate im Status 3 der Linie H signifikant von der Linie N ( $P = 0,011$ ) und von der Linie K ( $P = 0,028$ ). Zwischen den Linien N und K gab es keine signifikante Differenz im mitochondrialen Energiestoffwechsel. Die beobachteten tendenziellen Unterschiede in der mitochondrialen Atmungsrate zwischen den Linien im Versuchsansatz mit dem Substrat Glutamat-Malat konnten statistisch nicht abgesichert werden (Abb. 4-11).



**Abb.4-11:** Durchschnittliche Atmungsaktivität der Lebermitochondrien im Vergleich der Linien N, K, H

#### 4.3.3 Atmungsaktivität der Pectoralismi­to­chondrien

Im Status 2 der mitochondrialen Atmung lag der mittlere Verbrauch der Pectoralismi­to­chondrien mit dem Substrat Succinat bei  $22,80 \pm 8,73$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$ , mit dem Substrat Glutamat-Malat bei  $13,46 \pm 4,55$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  (Abb. 4-12). Im Status 3 betrug der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch der Pectoralismi­to­chondrien  $31,15 \pm 12,03$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  mit dem Substrat Succinat und  $20,07 \pm 7,22$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  mit dem Substrat Glutamat-Malat. Im Status 4 fiel die mittlere Atmungsrate dann auf  $21,90 \pm 8,22$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  mit dem Substrat Succinat und auf  $14,55 \pm 5,12$   $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  im Versuchsansatz mit Glutamat-Malat.



**Abb. 4-12:** Durchschnittliche Atmungsaktivität der Pectoralismi mitochondrien in den Stadien 2, 3 und 4

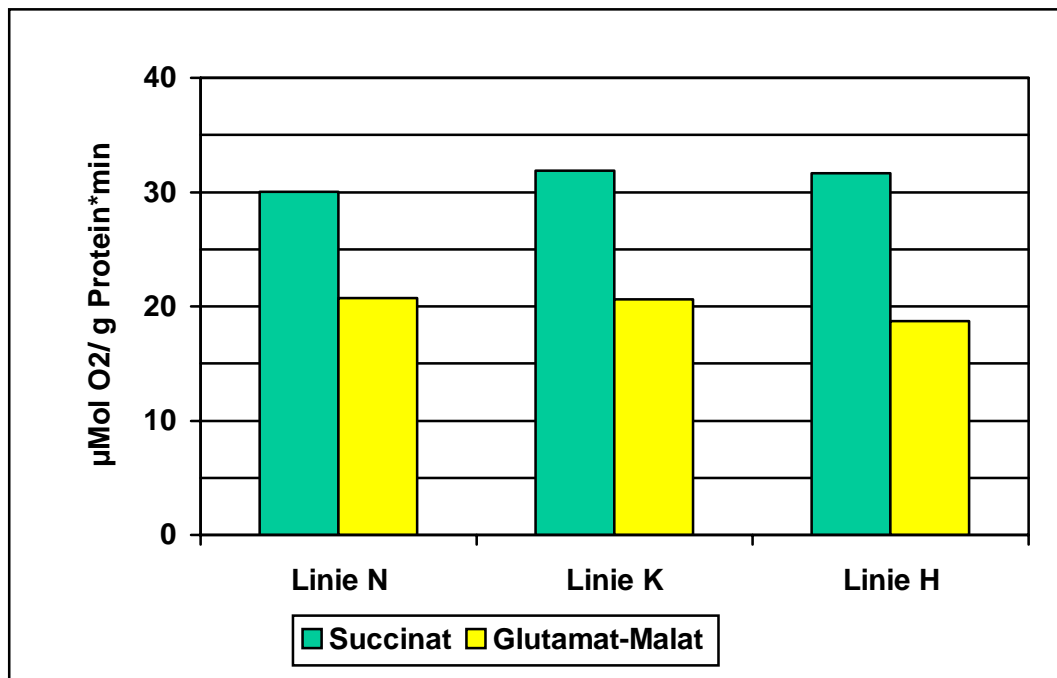
#### 4.3.3.1 Linienunterschiede in der Atmungsrate im Status 3 der Pectoralismi mitochondrien

Im Versuchsansatz mit dem Substrat Succinat liegt der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch der Linie K mit am höchsten, gefolgt von den Linien H und N (Tab. 4-4).

**Tab. 4-4:** Linienunterschiede im durchschnittlicher Sauerstoffverbrauch der Pectoralismi mitochondrien im Status 3 unter Verwendung der Substrate Succinat und Glutamat-Malat unter Angabe der Standardabweichung und der Probenanzahl

Sauerstoffverbrauch im Status 3			
Linie	in $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$		
	n	Substrat Succinat	Substrat Glutamat-Malat
N	34	$30,00 \pm 10,20$	$20,75 \pm 7,09$
K	33	$31,86 \pm 14,53$	$20,61 \pm 7,84$
H	30	$31,66 \pm 11,18$	$18,71 \pm 6,69$
Gesamt	97	$31,15 \pm 12,03$	$20,07 \pm 7,22$

Wie in Abb. 4-13 zu erkennen, sind die Atmungsraten der Brustmuskelmitochondrien in den Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Substraten nicht gleichgerichtet. Im Versuchsansatz mit dem Substrat Glutamat-Malat fallen die mitochondrialen Atmungsraten von der Linie N über die Linie K hin zur Linie H ab. Es bestehen keine statistisch abgesicherten Unterschiede im mitochondrialen Sauerstoffverbrauch der Brustmuskelmitochondrien.



**Abb. 4-13:** Durchschnittliche Atmungsaktivität der Pectoralismi­tochondrien im Vergleich der Linien N, K, H

#### 4.3.4 Einflussfaktoren auf die mitochondriale Atmungsaktivität von Leber- und Brustmuskel

Unter Berücksichtigung der fixen Effekte Linie und Versuchstag konnten im Versuchsansatz mit Lebermitochondrien und dem Substrat Succinat 37,5 % der Varianz in der Atmungsrate des Status 3 der Lebermitochondrien erklärt werden (Tab. 4-5). Beide Faktoren üben einen hochsignifikanten Einfluß auf die Ergebnisse aus. Die Varianz in der Atmungsrate konnte in den restlichen Versuchsansätzen (Lebermitochondrien: Glutamat-Malat, Pectoralismi­tochondrien: Succinat und Glutamat-Malat) zu 16,4 bis 28,8 % erklärt werden. Hierbei war jedoch der Einfluß der Linie nicht mehr statistisch abzusichern, während sich der Versuchstag weiterhin signifikant auswirkte.

**Tab. 4-5:** Randmitteleffekte und Signifikanzniveaus von Einflussfaktoren auf die mitochondriale Atmung von Leber- und Pectoralismatchondrien unter Verwendung verschiedener Atmungssubstrate und unter Angabe des wahren Mittelwertes und der Stichprobengröße

		Lebermitochondrien		Pectoralismatchondrien	
		Succinat	Glutamat-Malat	Succinat	Glutamat-Malat
n	ausgewertete Gewebeprouen	97	97	97	97
	wahrer Mittelwert	39,35	29,03	31,007	19,91
fixe Effekte:					
Linie	N	- 3,73 ***	- 1,59 n.s.	- 0,31 n.s.	+ 1,10 n.s.
	K	- 2,26 ***	- 0,7 n.s.	0,64 n.s.	+ 0,55 n.s.
	H	+ 5,98 ***	+ 2,28 n.s.	- 0,33 n.s.	- 1,65 n.s.
Versuchstag:					
	1	+ 7,48 ***	+ 4,56 ***	- 6,63 ***	- 2,28 *
	2	+ 0,98 ***	+ 0,2 ***	+ 7,58 ***	+ 3,12 *
	3	- 7,17 ***	- 5,18 ***	- 8,43 ***	- 4,56 *
	4	- 4,54 ***	+ 0,00 ***	+ 1,97 ***	+ 1,42 *
	5	+ 0,87 ***	- 0,1 ***	+ 0,77 ***	- 0,43 *
	6	+10,39 ***	+ 9,43 ***	+ 4,74 ***	+ 2,73 *
	7	-8,01 ***	- 8,9 ***		
erklärte Varianz		37,5 %	28,8 %	23,5 %	16,4 %

Unter Berücksichtigung der Einflussfaktoren Linie und Versuchstag wurde der Unterschied zwischen den Linien in der Atmungsrate der Lebermitochondrien mit dem Versuchsansatz unter Verwendung von Succinat als Substrat deutlicher als mit dem Substrat Glutamat-Malat. Die Linien N und H unterschieden sich in ihrer Atmungsrate hochsignifikant ( $P = 0,000$ ) voneinander. Eine hochsignifikante Differenz bestand weiterhin zwischen den Linien K und H ( $P = 0,002$ ). Beim Versuchsansatz unter Verwendung des Substrates Glutamat-Malat konnten die beobachteten Unterschiede nicht statistisch abgesichert werden.



Die Unterschiede in der Atmungsrate der Pectoralismatchondrien zwischen den Wachtellinien waren nicht mit denen der Lebermismatchondrien gleichgerichtet und auch bei der Verwendung der beiden Substrate differierten die Ergebnisse voneinander. Im paarweisen Vergleich der Atmungsraten der Pectoralismatchondrien konnten unter Berücksichtigung der Einflussfaktoren Linie und Versuchstag keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Linien festgestellt werden.

Der Versuchstag hatte in jedem Versuchsansatz einen signifikanten bis hochsignifikanten Einfluss auf die gemessenen Atmungsraten.

#### 4.3.5 Der Atmungskontrollindex RCR

Der Atmungskontrollindex RCR (respiratory control ratio) als Verhältnis zwischen den Atmungsraten in Status 3 und Status 4 lag für alle Mismatchondrien ungeachtet der Gewebeherkunft oder des verwendeten Substrates im Versuchsansatz stets über dem Wert 1 (Tab. 4-6). Insgesamt lag der RCR bei den Versuchsansätzen mit Lebermismatchondrien durchschnittlich höher als bei den Versuchsansätzen mit Pectoralismatchondrien.

**Tab. 4-6:** Mittelwerte und Standardabweichungen des RCR in Abhängigkeit von der Linie, der Mismatchondrienart und dem Substrat

		RCR-Quotient			
		Lebermismatchondrien		Pectoralismatchondrien	
Linie	n	Succinat	Glutamat-Malat	Succinat	Glutamat-Malat
N	34	1,64 ± 0,25	1,61 ± 0,32	1,36 ± 0,17	1,36 ± 0,18
K	33	1,71 ± 0,29	1,65 ± 0,35	1,43 ± 0,23	1,37 ± 0,24
H	30	1,87 ± 0,25	1,74 ± 0,22	1,53 ± 0,23	1,47 ± 0,26
Gesamt	97	1,73 ± 0,28	1,67 ± 0,30	1,44 ± 0,22	1,39 ± 0,23

Der durchschnittliche RCR-Wert stieg bei den Lebermismatchondrien von der Linie N über die Linie K zur Linie H an. Diese Linienunterschiede konnten für den Versuchsansatz mit dem Substrat Succinat statistisch abgesichert werden ( $P_{N/H} = 0,000$ ;  $P_{K/H} = 0,026$ ). Im

Versuchsansatz mit Glutamat-Malat bewegte sich der Unterschied zwischen der Linie N und H mit  $P = 0,074$  an der Signifikanzgrenze.

Dieselben Unterschiede zwischen den Linien konnten auch für die durchschnittlichen RCR-Werte der Pectoralismuskeln beobachtet werden. Hierbei konnte ein signifikanter bzw. hochsignifikanter Unterschied zwischen der Linie N und der Linie H im Versuchsansatz mit Succinat bzw. mit Glutamat –Malat festgestellt werden. ( $P_{\text{Succinat:N/H}} = 0,001$  bzw.  $P_{\text{Glutamat-Malat:N/H}} = 0,05$ ).

#### 4.3.6 Effektivität der mitochondrialen Atmung: Der ADP/O-Quotient

Der ADP/O-Quotient gibt das Verhältnis zwischen der Menge des im Status 3 phosphorylierten ADP und dem hierbei verbrauchten Sauerstoff an und ist somit ein Maß für die Effektivität der oxidativen Phosphorylierung.

In Tab. 4-7 sind die durchschnittlichen ADP/O-Quotienten für die verschiedenen Linien, Mitochondrienarten und Substrate dargestellt.

**Tab. 4-7:** Mittelwerte der ADP/O-Quotienten in Abhängigkeit von Linie, Mitochondrienart und Substrat

Linie	nMol ADP/nAtom O				
	Lebermitochondrien			Pectoralismitochondrien	
	n	Succinat	Glutamat-Malat	Succinat	Glutamat-Malat
N	34	$2,02 \pm 0,55$	$1,97 \pm 0,60$	$2,13 \pm 0,75$	$1,87 \pm 0,46$
K	33	$2,19 \pm 0,72$	$2,06 \pm 0,57$	$2,28 \pm 0,54$	$1,98 \pm 0,52$
H	30	$2,33 \pm 0,73$	$2,25 \pm 0,66$	$2,17 \pm 0,56$	$2,03 \pm 0,52$
Gesamt	97	$2,17 \pm 0,67$	$2,09 \pm 0,61$	$2,19 \pm 0,62$	$1,95 \pm 0,50$

In allen Versuchsansätzen bis auf Pectoralismitochondrien mit dem Substrat Succinat ist ein Anstieg von der Linie N über die Linie K zur Linie H zu verzeichnen. Die Unterschiede können zwar noch nicht statistisch abgesichert werden, sie sind jedoch im Trend deutlich vorteilhaft für die Linie H gegenüber der Linie N gerichtet. Der

Versuchstag übt einen hochsignifikanten Einfluß ( $P = 0,000$ ) auf den ADP/O-Quotienten in den Versuchsansätzen mit Lebermitochondrien aus.

#### **4.4 Korrelationen zwischen embryonalen und mitochondrialen Atmungsparametern**

Es wurden Korrelationsanalysen zwischen dem embryonalen Sauerstoffverbrauch am 7. und am 12. Brutttag und Parametern der mitochondrialen Atmungsaktivität durchgeführt. Tab. 4-8 zeigt die Korrelationen der embryonalen mit der mitochondrialen Atmungsaktivität. Die embryonalen Atmungsraten der beiden Bruttage wiesen untereinander eine hochsignifikante mittlere Korrelation auf. Der Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien gleicher Herkunft unter Verwendung unterschiedlicher Substrate war hochsignifikant hoch korreliert. Der embryonale Sauerstoffverbrauch am 12. Brutttag und der mitochondriale Sauerstoffverbrauch im Lebergewebe mit dem Substrat Succinat waren auf mittlerem Niveau hochsignifikant miteinander korreliert.

Weiterhin –nicht in der Tabelle dargestellt– zeigten sich mittlere, teilweise hochsignifikante Korrelationen zwischen dem embryonalen Sauerstoffverbrauch und den RCR-Werten der Lebermitochondrien. Die embryonale Atmung war nicht korreliert mit den ADP/O-Quotienten der vier mitochondrialen Versuchsansätze.

**Tab. 4-8:** Korrelationen (r) zwischen dem embryonalen Sauerstoffverbrauch am 7. Brutttag und am 12. Brutttag und dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Status 3 (St3) von Leber (L) - und Pectoralismatchondrien (P) unter Verwendung der Substrate Succinat (S) und Glutamat-Malat (G) unter Angabe der Signifikanz (P) und der Anzahl berücksichtigter Tiere (N)

<b>Merkmal</b>	<b>O 7</b>	<b>O 12</b>	<b>St3LS</b>	<b>St3LG</b>	<b>St3PS</b>	<b>St3PG</b>
<b>O 7</b>	<b>r = 1</b>  N = 369	<b>r = 0,290</b> P = 0,000 N = 348	<b>r = 0,143</b> P = 0,163 N = 97	<b>r = 0,101</b> P = 0,325 N = 97	<b>r = -0,017</b> P = 0,871 N = 97	<b>r = -0,010</b> P = 0,926 N = 97
<b>O 12</b>		<b>r = 1</b>  N = 348	<b>r = 0,272</b> P = 0,007 N = 97	<b>r = 0,154</b> P = 0,131 N = 97	<b>r = -0,029</b> P = 0,781 N = 97	<b>r = -0,095</b> P = 0,353 N = 97
<b>St3LS</b>			<b>r = 1</b>  N = 97	<b>r = 0,702</b> P = 0,000 N = 97	<b>r = 0,059</b> P = 0,567 N = 97	<b>r = -0,031</b> P = 0,764 N = 97
<b>St3LG</b>				<b>r = 1</b>  N = 97	<b>r = 0,031</b> P = 0,760 N = 97	<b>r = -0,065</b> P = 0,530 N = 97
<b>St3PS</b>					<b>r = 1</b>  N = 97	<b>r = 0,656</b> P = 0,000 N = 97
<b>St3PG</b>						<b>r = 1</b>  N = 97

Tab. 4-9 zeigt die Korrelationen der mitochondrialen Atmungsraten mit den ADP/O-Quotienten als Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung. Der Sauerstoffverbrauch der Lebermitochondrien mit dem Substrat Succinat wies mittlere, teilweise hochsignifikante Korrelationen mit den ADP/O-Quotienten sämtlicher Versuchsansätze auf. Weitere mittlere, teils hochsignifikante Korrelationen zeigten sich zwischen der Atmungsaktivität und dem ADP/O-Quotienten der Lebermitochondrien mit

dem Substrat Glutamat-Malat sowie der Atmungsaktivität und dem ADP/O-Quotienten der Pectoralismatchochondrien mit dem Substrat Succinat.

**Tab. 4-9:** Korrelationen (r) zwischen dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Status 3 (St3) und dem ADP/O-Quotienten von Leber (L) - und Pectoralismatchochondrien (P) unter Verwendung der Substrate Succinat (S) und Glutamat-Malat (G) unter Angabe der Signifikanz (P)

<b>Merkmal</b>	<b>ADPOL S</b>	<b>ADPOL G</b>	<b>ADPOP S</b>	<b>ADPOP G</b>
<b>St3LS</b>	<b>r = 0,265</b> P = 0,009	<b>r = 0,260</b> P = 0,010	<b>r = 0,222</b> P = 0,029	<b>r = 0,279</b> P = 0,006
<b>St3LG</b>	<b>r = 0,178</b> P = 0,081	<b>r = 0,391</b> P = 0,000	<b>r = 0,192</b> P = 0,060	<b>r = 0,272</b> P = 0,007
<b>St3PS</b>	<b>r = -0,020</b> P = 0,844	<b>r = -0,024</b> P = 0,816	<b>r = 0,213</b> P = 0,036	<b>r = 0,118</b> P = 0,248
<b>St3PG</b>	<b>r = -0,017</b> P = 0,867	<b>r = -0,047</b> P = 0,644	<b>r = 0,193</b> P = 0,058	<b>r = 0,125</b> P = 0,223

**Tab. 4-10:** Korrelationen (r) zwischen dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Status 3 (St3) und dem Atmungskontrollindex RCR von Leber (L) - und Pectoralismatchochondrien (P) unter Verwendung der Substrate Succinat (S) und Glutamat-Malat (G) unter Angabe der Signifikanz (P)

<b>Merkmal</b>	<b>RCRL S</b>	<b>RCRL G</b>	<b>RCRP S</b>	<b>RCRP G</b>
<b>St3LS</b>	<b>r = 0,412</b> P = 0,000	<b>r = 0,163</b> P = 0,111	<b>r = 0,038</b> P = 0,712	<b>r = -0,118</b> P = 0,251
<b>St3LG</b>	<b>r = 0,274</b> P = 0,007	<b>r = 0,296</b> P = 0,003	<b>r = 0,059</b> P = 0,568	<b>r = -0,219</b> P = 0,031
<b>St3PS</b>	<b>r = -0,027</b> P = 0,796	<b>r = 0,007</b> P = 0,943	<b>r = 0,205</b> P = 0,044	<b>r = 0,088</b> P = 0,391
<b>St3PG</b>	<b>r = -0,002</b> P = 0,985	<b>r = -0,100</b> P = 0,329	<b>r = 0,065</b> P = 0,530	<b>r = 0,248</b> P = 0,014

Tab. 4-10 zeigt die Korrelationen der Atmungsrate der Mitochondrien mit dem Atmungskontrollindex RCR, der ein Maß für die Intaktheit der inneren Mitochondrienmembran ist. Die jeweiligen Atmungsraten aller vier Versuchsansätze sind auf mittlerem Niveau teilweise hochsignifikant mit ihren RCR korreliert. Weiterhin bestehen mittlere, signifikante bis hochsignifikante Korrelationen zwischen der Atmungsaktivität von Lebermitochondrien mit dem Substrat Glutamat-Malat und den RCR der übrigen Versuchsansätze mit Ausnahme von Pectoralismiitochondrien mit dem Substrat Succinat.

In Tab. 4-11 sind die Korrelationen der Atmungskontrollindices RCR mit den ADP/O-Quotienten dargestellt. Der RCR von Lebermitochondrien mit dem Substrat Succinat weist hochsignifikante mittlere Korrelationen mit den ADP/O-Quotienten beider Ansätze mit Lebermitochondrien sowie des Ansatzes mit Pectoralismiitochondrien und dem Substrat Glutamat-Malat auf. Der RCR der Lebermitochondrien mit dem Substrat Glutamat-Malat ist mit dem ADP/O-Quotienten desselben Ansatzes hochsignifikant auf mittlerem Niveau korreliert.

**Tab. 4-11:** Korrelationen (r) zwischen Atmungskontrollindex RCR und dem ADP/O-Quotienten von Leber (L) - und Pectoralismiitochondrien (P) unter Verwendung der Substrate Succinat (S) und Glutamat-Malat (G) unter Angabe der Signifikanz (P)

<b>Merkmal</b>	<b>ADPOLS</b>	<b>ADPOLG</b>	<b>ADPOPS</b>	<b>ADPOPG</b>
<b>RCRLS</b>	<b>r = 0,372</b> P = 0,000	<b>r = 0,289</b> P = 0,004	<b>r = 0,084</b> P = 0,411	<b>r = 0,299</b> P = 0,003
<b>RCRLG</b>	<b>r = 0,112</b> P = 0,276	<b>r = 0,306</b> P = 0,002	<b>r = 0,073</b> P = 0,475	<b>r = 0,097</b> P = 0,346
<b>RCRPS</b>	<b>r = -0,147</b> P = 0,152	<b>r = -0,096</b> P = 0,348	<b>r = 0,062</b> P = 0,545	<b>r = -0,075</b> P = 0,468
<b>RCRPG</b>	<b>r = -0,075</b> P = 0,464	<b>r = -0,057</b> P = 0,577	<b>r = -0,081</b> P = 0,430	<b>r = -0,057</b> P = 0,578

## 4.5 Aktivitäten der ATPasen im Gehirn

### 4.5.1 ATPase-Aktivität im Gehirn: Mittelwertvergleich der Linien N, K und H

Die Gehirnproben der Wachtellinie N wiesen im Vergleich mit den Linien K und H eine geringfügig höhere durchschnittliche Gesamt-ATPase-Aktivität auf, die im Versuchsansatz ohne Ouabain bestimmt wurde (Tab. 4-12). Die Linie N erbrachte auch die höchste durchschnittliche Aktivität der Mg-ATPase.

Die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase lag bei der Linie H am höchsten. Die Unterschiede zwischen den Enzymaktivitäten der drei Linien konnten nicht statistisch abgesichert werden.

**Tab. 4-12:** Durchschnittliche Enzymaktivitäten von Gesamt-ATPase,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase und  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase im Gehirn

Mittelwerte der ATPase-Aktivität in $\mu\text{mol}$ freigesetzten $\text{P(i)}$ / mg Protein und h				
Linie	n	Gesamt-ATPase	Mg-ATPase	Na-K-ATPase
N	34	$21,68 \pm 0,39$	$10,04 \pm 0,30$	$11,63 \pm 0,27$
K	33	$21,61 \pm 0,29$	$10,00 \pm 0,21$	$11,61 \pm 0,25$
H	30	$21,61 \pm 0,24$	$10,01 \pm 0,25$	$11,94 \pm 1,74$
Gesamt	97	$21,63 \pm 0,32$	$10,02 \pm 0,25$	$11,72 \pm 0,99$

#### 4.5.2 Korrelationen zwischen den ATPase-Aktivitäten im Gehirn und anderen Messergebnissen

In Tab. 4-13 sind die an 97 Tieren errechneten Korrelationen zwischen den verschiedenen ATPasen untereinander und ihre Korrelationen mit der mitochondrialen Atmungsaktivität dargestellt. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen für die Gesamt-ATPase, die Mg-ATPase und die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase sind untereinander eng korreliert. Dahingegen ergeben sich keine statistischen Hinweise auf eine Korrelation der ATPase-Aktivitäten mit den Messungen der embryonalen bzw. der mitochondrialen Atmungsaktivität, der Intaktheit der Mitochondrien oder der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung.

**Tab. 4-13:** Korrelationen (r) zwischen mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Status 3 (St3) von Leber (L) - und Pectoralismatchondrien (P) unter Verwendung der Substrate Succinat (S) und Glutamat-Malat (G) und der Gesamt-, Mg- und Na-K-Atpase-Aktivität im Gehirn unter Angabe der Signifikanz (P)

Merkmal	Gesamt-ATP	Mg-ATP	Na-K-ATP
St3LS	<b>r = 0,114</b> P = 0,265	<b>r = 0,127</b> P = 0,217	<b>r = -0,043</b> P = 0,674
St3LG	<b>r = 0,146</b> P = 0,153	<b>r = 0,136</b> P = 0,183	<b>r = -0,013</b> P = 0,902
St3PS	<b>r = -0,007</b> P = 0,944	<b>r = 0,022</b> P = 0,834	<b>r = -0,054</b> P = 0,601
St3PG	<b>r = -0,013</b> P = 0,902	<b>r = -0,034</b> P = 0,740	<b>r = -0,041</b> P = 0,689
Gesamt-ATP	<b>r = 1</b>	<b>r = 0,601</b> P = 0,000	<b>r = 0,221</b> P = 0,029
Mg-ATP		<b>r = 1</b>	<b>r = 0,356</b> P = 0,000
Na-K-ATP			<b>r = 1</b>



## 5 Diskussion

Die Tierhaltung in der Landwirtschaft ist in den vergangenen 30 bis 40 Jahren zunächst vom Wunsch nach Arbeitserleichterung und höherem Verdienst, später von effektiv sinkenden Erzeugerpreisen bei gleichzeitig immer strengeren Ansprüchen an die Lebensmittelhygiene beeinflusst worden. Die Konsequenz hieraus war eine deutliche Vergrößerung der Haltungssysteme mit hohen Tierzahlen und fortschreitender Automatisierung (GUÉMENÉ und FAURE, 2004).

Im gleichen Zeitraum hat sich in Europa auch für lebensmittelproduzierende Tiere ein zunehmendes Tierschutzbewusstsein entwickelt. Die intensive Tierhaltung zur Lebensmittelproduktion mit industriellem Charakter ist immer wieder scharfer Kritik ausgesetzt. Im Verständnis vieler Verbraucher und Tierschützer hat besonders die kommerzielle Geflügelhaltung mit ihren hohen Tierzahlen ein negatives Image als Inbegriff nicht artgerechter Massentierhaltung, so dass ihre Produkte teilweise boykottiert werden (FAURE und MILLS, 1995). Die Forderung nach artgerechter Tierhaltung steht allerdings oft im Gegensatz zum Kaufverhalten der Konsumenten, die mehrheitlich die billigste Ware favorisieren.

Der Tierschutz hat mit der Aufnahme in den Artikel 20a des Grundgesetzes als Staatsziel (01.08.2002) in der Bundesrepublik Deutschland Verfassungsrang erhalten und ist nun anderen Grundrechten gleichgestellt. Auf europäischer Ebene hat der Gesetzgeber Verordnungen erlassen, die gewisse Mindeststandards in der Haltung von Nutztieren garantieren sollen. Die herkömmliche Käfighaltung wird mit hoher Wahrscheinlichkeit ab dem 01.01.2012 EU-weit verboten. Die Legehennenverordnung vom 13.3.2002 schreibt Nester, Sitzstangen und Einstreu vor (FAURE, 1999; GUÉMENÉ und FAURE, 2004).

Auf dem Geflügelsektor hat die ausschließlich produktionsorientierte Selektion der letzten Jahrzehnte teilweise zu konstitutionellen Problemen der Tiere, aber auch zu Verhaltensdefiziten wie vermehrter Aggressionsneigung gegen Artgenossen und erhöhter Stressanfälligkeit geführt. Diesen unerwünschten Nebeneffekten der Leistungszucht sollte entgegengesteuert werden, um das Wohlergehen der Tiere und die Qualität der Erzeugnisse zu verbessern, ohne jedoch gleichzeitig die Produktion unwirtschaftlich zu machen. (FAURE et al., 2003; FAURE und MILLS, 1995 und 1998; GUÉMENÉ und FAURE, 2004; JONES und HOCKING, 1999; MIGNON-GRASTEAU und FAURE, 2002).

Die zum Teil im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen haben gezeigt, dass viele Verhaltensmerkmale allein durch Selektion des phänotypischen Merkmals in die

gewünschte Richtung gesteuert werden können. So wurden an japanischen Wachteln die Stressanfälligkeit und die soziale Motivation erfolgreich beeinflusst (FAURE und MILLS, 1991; SATTERLEE und JOHNSON, 1988).

Eine Leidenssituation für Tiere kann ebenfalls entstehen, wenn sie ein arttypisches essentielles Verhalten nicht ausüben können. Frustration, Leerlaufhandlungen und möglicherweise Stereotypen sind die Folge. Beispiele für solche Verhaltensweisen sind das Nestbauverhalten oder die Staubbadeaktivität. GERKEN (1983) zeigte an japanischen Wachteln, dass sich die Staubbadeaktivität der Tiere durch eine Zweiwegeselektion sehr effektiv steigern oder verringern lässt. So entstanden innerhalb von drei Generationen die Linien N und H mit niedriger bzw. hoher Staubbadeaktivität sowie die unselektierte Kontrolllinie K. Diese drei Linien unterscheiden sich im Merkmal Staubbadeaktivität hochsignifikant. Es ist davon auszugehen, dass die genetische Grundlage dieses Merkmals bestimmte Abläufe im Organismus steuert, die letztendlich eine hohe oder niedrige Staubbadeaktivität zur Folge haben. Ein direkter Einfluss der Linienzugehörigkeit auf unterschiedliche Leistungsparameter der Wachteln konnte allerdings beim Vergleich der Linien N, K und H statistisch nicht nachgewiesen werden (GERKEN, 1991).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden an Wachteln der Linien N, K und H Untersuchungen zur Quantifizierung der zellphysiologischen Effekte der Selektion auf Staubbadeaktivität durchgeführt. Hierfür wurden Merkmale des Energiestoffwechsels herangezogen, da dieser im Hinblick auf die allgemeine Aktivität der Tiere und für die Muskelfunktion von besonderem Interesse ist.

Der embryonale Sauerstoffverbrauch ist ein Parameter des Energiestoffwechsels, der sich an Bruteiern verhältnismäßig einfach bestimmen lässt. Er hat sich in verschiedenen Untersuchungen als guter Indikator für die Vitalität der Vogelembryonen sowie teilweise für die spätere Leistungsfähigkeit der Tiere erwiesen (GAULY, 1991; GAULY et al., 2001; GRÖSCHL, 1998; HILLER, 1994; KESSLER, 1998; MEYER, 2002; REINER und DZAPO, 1995). In der vorliegenden Arbeit überprüften wir die embryonale Atmungsaktivität auf frühe Unterschiede zwischen den Linien N, K und H.

Weiterhin untersuchten wir mögliche Auswirkungen der Selektion auf die mitochondriale Atmungsaktivität bestimmter Gewebe. Schon mehrfach konnten Zusammenhänge zwischen dem Energiestoffwechsel landwirtschaftlicher Nutztiere und der Atmungsaktivität ihrer Mitochondrien nachgewiesen werden (DZAPO et al., 1973 und

1983; DZAPO und WASSMUTH, 1977, 1979 a und b, 1982, 1983, 1984; SOMMER, 1986; STEPHAN, 1993).

Zusätzlich zu den Messungen der embryonalen und mitochondrialen Atmungsrate wurde an Gehirnproben der Wachteln die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  bestimmt. Dieser membranständige Ionentransporter ist indirekt abhängig von der ATP-Produktion der Mitochondrien, verantwortlich für den Aufbau des Membranpotentials an tierischen Zellen und somit auch für die Reizweiterleitung an Neuronen. Es wäre daher denkbar, dass eine Aktivitätsänderung dieses Membranproteins eine Rolle bei bestimmten Verhaltensänderungen spielt.

Die möglichen Einflussfaktoren auf die gewonnenen Untersuchungsergebnisse wurden analysiert, wobei besonders die Rolle der Linienzugehörigkeit interessierte. Es wurde eine Korrelationsanalyse der Ergebnisse untereinander durchgeführt, um mögliche Zusammenhänge der unterschiedlichen Stoffwechselfparameter zu beleuchten.

Analog zu anderen Autoren (GAULY, 1991; GRÖSCHL, 1998; KESSLER, 1998; REINER und DZAPO, 1995) wurde zunächst in einem Vorversuch der embryonale Sauerstoffverbrauch täglich gemessen, um den Verlauf der embryonalen Atmungsaktivität bei Wachteln darstellen zu können. Die hierbei entstandene Kurve zeigt für den 13. Bruttag einen ersten Einbruch der Atmungsaktivität. Bei Hühnern konnte eine ähnliche Stagnation um den 17./18. Tag beobachtet werden. Dieses Stadium der ersten Abflachung der Verbrauchskurve wird als Phase 3 bezeichnet und ist im Überschreiten der maximalen Leistungsfähigkeit des Allantochorions begründet, das gleichzeitig im Bereich des Kükenkopfes von der Amnionhöhle verdrängt wird (KESSLER, 1998). Nach einem erneuten Anstieg des Sauerstoffverbrauchs am 14. Tag weist die Atmungskurve für Wachtelembryonen zum Zeitpunkt des internal pipping (IP) um den 15. Tag die für Nestflüchter typische Plateauphase auf, wie sie auch von anderen Autoren regelmäßig beobachtet wurde (GAULY, 1991; GAULY et al., 2001; GRÖSCHL, 1998; HILLER, 1994; HOYT, 1987; HOYT und RAHN, 1980; KESSLER, 1998; MEYER, 2002; REINER und DZAPO, 1995; VLECK et al., 1980; VLECK und VLECK, 1987).

Für die Messungen im Hauptversuch wurden aufgrund des Kurvenverlaufs der 7. und der 12. Bruttag ausgewählt, da in dieser Phase ein kontinuierlicher Anstieg der Atmungsrate stattfand und vergleichbare Ergebnisse zu erwarten waren. Auch HILLER (1994) führte bei Hühnern Messungen an zwei Terminen durch, die Beginn und Ende der zweiten Phase der Embryonalentwicklung markieren sollten.

Insgesamt schlüpften aus 369 befruchteten Bruteiern 308 Küken. Von den 61 Tieren, die nicht zum Schlupf gelangten, starben 66 % erst nach dem zwölften Bruttag ab und wurden somit zu den „Steckenbleibern“ gezählt. Auch andere Untersuchungen verzeichneten die höchsten Verlustraten in der letzten Phase der Brutzeit (HILLER, 1998; KESSLER, 1998), was damit erklärt werden kann, dass die weniger vitalen Küken die Umstellung des embryonalen Stoffwechsels auf Lungenatmung nicht erfolgreich bewältigten. Die Zugehörigkeit zu einer der Linien N, K oder H wirkte sich nicht signifikant auf die Verlust- oder Schlupfraten aus.

Der durchschnittliche Sauerstoffbedarf pro Gramm Eifrischmasse über die gesamte Brutzeit hinweg lag für die Wachtelembryonen mit ca.  $150 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 / \text{gr}$  in derselben Größenordnung wie der von Fasanenembryonen mit  $148 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 / \text{gr}$  (GAULY, 1991). Deutlich weniger verbrauchten Hühnerembryonen mit ca.  $94 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 / \text{gr}$  (KESSLER, 1998), Putenembryonen mit  $77 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 / \text{gr}$  (GRÖSCHL, 1998) und Straußenembryonen mit  $45 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 / \text{gr}$  (REINER und DZAPO, 1995).

Der embryonale Sauerstoffverbrauch wurde signifikant bis hochsignifikant von der Eifrischmasse beeinflusst; schwerere Eier wiesen höhere Atmungsraten auf als leichte. Ähnliche Zusammenhänge beobachteten GAULY (1991), GRÖSCHL (1998) und MEYER (2002) an Fasanen, Puten und Enten. Die Vitalität der Wachtelembryonen war an beiden Messterminen positiv mit dem Sauerstoffverbrauch korreliert. Schlupffähige Tiere verbrauchten signifikant mehr Sauerstoff als Tiere, die während der Brut abstarben. Auch dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (GAULY, 1991; GAULY et al., 2001; GRÖSCHL, 1998; HILLER, 1994; KESSLER, 1998; MEYER, 2002; REINER und DZAPO, 1995).

Sowohl am 7. als auch am 12. Bruttag zeigten sich die Embryonen der auf hohe Staubbadeaktivität selektierten Linie H in ihrem Sauerstoffkonsum den Linien N und K signifikant bis hochsignifikant überlegen. Beide Male wies die Linie der niedrigen Staubbadeaktivität N den niedrigsten Mittelwert für die embryonale Atmung auf, während die Kontrolllinie K stets zwischen diesen beiden Extremen lag. Der Unterschied zwischen den Linien N und K war am ersten Messtermin schon tendenziell nachweisbar, am zweiten Messtermin dann hochsignifikant.

Der Faktor „Zugehörigkeit zur Linie N, K oder H“ hatte an beiden Bruttagen einen hochsignifikanten Einfluss auf den embryonalen Sauerstoffverbrauch. Dies stellt einen ersten Hinweis für eine Auswirkung der Selektion auf den Energiestoffwechsel der Wachteln dar. In welchen Organen diese Veränderungen lokalisiert sind, kann zu diesem

Zeitpunkt noch nicht festgestellt werden, da die Messungen an Bruteiern stets den Sauerstoffbedarf des gesamten Organismus widerspiegeln.

Dies könnte bedeuten, dass eine erhöhte Staubbadeaktivität mit einem generell intensiveren Stoffwechsel einhergeht und dass Tiere mit niedrigerer Staubbadeaktivität auch einen niedrigeren Grundumsatz aufweisen.

Für die Bestimmung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität bot sich als Probenentnahmestelle die Leber mit ihrer beherrschenden Stellung im Intermediärstoffwechsel der Kohlehydrate, Proteine und Fette an. Für die zahlreichen in ihr lokalisierten Abbau- und Synthesevorgänge benötigt die Leber viel Energie in Form von ATP und weist deshalb in ihren Zellen eine besonders hohe Mitochondriendichte auf. An Lebermitochondrien lassen sich stellvertretend für den gesamten Organismus Veränderungen des Energiestoffwechsels und der Leistungsfähigkeit beobachten. Sie sind schon mehrfach für Untersuchungen verschiedener Geflügelarten herangezogen wurden (BOBYLEVA-GUARRIERO et al., 1984; BROWN et al., 1986; GRÖSCHL, 1998; HILLER, 1994; MEYER, 2002; SOMMER, 1986).

Als zweite Entnahmestelle für Gewebeproben wurde der tiefe Brustmuskel (*M. pectoralis profundus*) ausgewählt, da er beim Staubbaden gewissermaßen das ausführende Organ ist. So sollte geklärt werden, ob eine Zunahme der Staubbadeaktivität auch Ausdruck in einer veränderten mitochondrialen Leistungsfähigkeit dieses Muskels findet.

An den isolierten Mitochondrien wurde der Sauerstoffverbrauch während der oxidativen Phosphorylierung gemessen. Als Substrate kamen in getrennten Versuchsansätzen Succinat und Glutamat-Malat zum Einsatz, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Atmungskette eintreten. Mit den Ergebnissen dieser Messungen wurden anschließend der Atmungskontrollindex RCR und der ADP/O-Quotient berechnet. Der RCR dient als Kontrolle für die Unversehrtheit der mitochondrialen Membranen, während der ADP/O-Quotient ein Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung ist.

Die Atmungsaktivität isolierter Lebermitochondrien mit dem Substrat Succinat im Status 3 betrug bei den drei Wachtellinien im Schnitt rund 39,6  $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min.}$

Bei gleicher Gewebeart und Substrat fand GRÖSCHL (1998) an Puten schwerer genetischer Herkunft abhängig von Alter und Geschlecht Atmungsraten zwischen 17,4 und 23,0  $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min.}$  HILLER (1994) beobachtete an Lebermitochondrien von Legehybriden mit dem Substrat Succinat einen Sauerstoffverbrauch von

49,7  $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min.}$  SOMMER (1986) fand an Legehybriden unterschiedlicher genetischer Herkunft Werte von 34,0 bis 44,7  $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min.}$  Isolierte Lebermitochondrien von Flugenten verbrauchten mit Succinat geschlechtsabhängig zwischen 82,3 und 93,4  $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  (MEYER, 2002). Bei diesem Vergleich lag die Atmungsaktivität der Wachtelmitochondrien aus der Leber mit dem Substrat Succinat also im unteren Mittelfeld. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass in den genannten Untersuchungen nicht nur andere Vogelarten, sondern zum Teil auch andere Gewebemengen, Isolationsmethoden und Substratmengen eingesetzt wurden, was eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert.

Die Atmungsrate der Lebermitochondrien mit dem Substrat Glutamat-Malat betrug für die drei Wachtellinien im Schnitt 29,4  $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min.}$  Auch SOMMER (1986) beobachtete für dieses Substrat niedrigere Atmungsraten, die je nach genetischer Herkunft zwischen 23,7 und 30  $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  betrugen.

Die Atmungsrate der Lebermitochondrien zeigte mit dem Substrat Succinat einen Anstieg der Werte von der Linie N über die Linie K hin zur Linie H. Die Unterschiede zwischen der Linie H und den Linien N und K waren hochsignifikant. Der Faktor „Linie“ hatte einen hochsignifikanten Einfluss auf diese Messergebnisse.

Die Werte für die Atmungsaktivität der Lebermitochondrien mit dem Substrat Glutamat-Malat wiesen eine analoge Rangierung mit einem Anstieg von N über K nach H auf, die statistisch jedoch noch nicht abgesichert werden konnte.

Der Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien des tiefen Brustmuskels (*M. pectoralis profundus*) mit dem Substrat Succinat lag im Status 3 bei rund 31,2  $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  und somit etwas niedriger als die Resultate der Lebermitochondrien. Auch mit dem Substrat Glutamat-Malat war die Atmungsrate der Pectoralismatchondrien im Status 3 mit rund 20,1  $\mu\text{Mol O}_2/\text{g Protein und min}$  niedriger als die der Lebermitochondrien. Zur Stoffwechselrate isolierter Pectoralismatchondrien liegen bisher keine Vergleichswerte anderer Autoren vor.

Eine einheitliche Rangierung der Linien N, K und H konnte bei den Messungen an Pectoralismatchondrien nicht beobachtet werden. Der Einfluss der Linienzugehörigkeit auf die Atmungsrate dieser Gewebeart war statistisch noch nicht abzusichern.

Der Durchschnittswert für den Atmungskontrollindex RCR lag für die Lebermitochondrien mit dem Substrat Succinat mit 1,73 etwas höher als mit dem Substrat Glutamat-Malat

(1,67) und bewegte sich in der gleichen Größenordnung wie bei Puten, Hühnern und Flugenten (GRÖSCHL, 1998; HILLER, 1994; MEYER, 2002). Lediglich SOMMER (1986) stellte bei Legehybriden mehrfach eine entkoppelte mitochondriale Atmung mit Werten unter 1 fest.

Die Pectoralismatchondrien wiesen mit 1,44 (Succinat) bzw. 1,39 (Glutamat-Malat) geringere Werte auf. Insgesamt lag der RCR jedoch für alle vier Versuchsansätze stets über 1 und belegte somit die Intaktheit der mitochondrialen Membranen.

Die Linie H wies für alle vier Versuchsansätze die höchsten Durchschnittswerte für den RCR auf, gefolgt von den Linien K und N. Die Unterschiede zwischen den Selektionslinien N und H waren bei den Messungen an Lebermismatchondrien mit Succinat und an Pectoralismatchondrien signifikant bis hochsignifikant. Für die Lebermismatchondrien mit Glutamat-Malat bewegten sie sich an der Signifikanzgrenze. Bei größeren Stichproben wäre zu erwarten, dass sämtliche Linienunterschiede die Signifikanzgrenze überschreiten. Insgesamt zeichnen sich die Mismatchondrien der Linie H also durch einen geringeren Entkopplungsgrad bzw. eine größere Intaktheit aus als die der Linien N und K.

Die ADP/O-Quotienten der Wachtelmismatchondrien bewegten sich im oberen Bereich der für andere Vogelarten gefundenen Werte (GRÖSCHL, 1998; HILLER, 1994; MEYER, 2002). Dies spricht für eine hohe Effizienz der oxidativen Phosphorylierung.

Bis auf die Messungen an Pectoralismatchondrien mit dem Substrat Succinat zeigen alle Versuche einen Anstieg der Werte von der Linie N über K zu H, der allerdings bei einer Stichprobengröße von 97 noch nicht statistisch abgesichert werden konnte.

Insgesamt lässt die Auswertung der mitochondrialen Parameter deutliche Unterschiede zwischen den Linien N, K und H erkennen, die zum großen Teil auch statistisch abgesichert werden können. Hierbei zeigt sich eine Überlegenheit der auf hohe Staubbadeaktivität selektierten Linie H in der Atmungsaktivität der Lebermismatchondrien, in der Intaktheit der Membranen sowie in der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung. Die Linienunterschiede sind trotz der vergleichsweise geringen Stichprobengröße zumeist signifikant; die Linienzugehörigkeit hat einen teilweise hochsignifikanten Einfluss auf die Messresultate. Diese Ergebnisse sprechen für einen positiven Zusammenhang zwischen der Selektion auf Staubbadeaktivität und Parametern der mitochondrialen Atmung, der bei höheren Tierzahlen vermutlich noch deutlicher statistisch abgesichert werden könnte. Die

herausragende Bedeutung der Leber für die Gesamtstoffwechsellaage des Organismus wird bestätigt.

In den Aktivitätsmessungen der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in den Gehirnproben von 97 Wachteln wies die Linie H die höchsten Durchschnittswerte auf. Für die  $\text{Mg}^+\text{-ATPase}$  sowie für die Summe der beiden Enzymaktivitäten (Gesamt-ATPase) war dies jedoch nicht der Fall, und auch die Überlegenheit bei der Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  konnte nicht statistisch abgesichert werden. Insgesamt ergaben sich weder einheitliche Rangierungen noch statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den Linien N, K und H.

Aufgrund der entscheidenden Rolle der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  beim Aufbau des Membranpotentials tierischer Zellen und somit für die Reizweiterleitung an Neuronen hätten Veränderungen ihrer Aktivität der Grund für ein verändertes Verhalten der Wachteln sein können. Es gibt durchaus Hinweise auf eine Bedeutung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität für Zustände erhöhter oder herabgesetzter neurologischer Erregbarkeit (Akagawa et al., 1980; Alexander et al., 1986; Dick et al., 1978; Glen, 1968; Hokin-Neaverson et al., 1975 und 1976; Linnolia et al., 1983; Naylor et al., 1973; OAKNIN et al., 1989; REDDY et al., 1989; SENGUPTA et al., 1980).

Ziel der aufgeführten Untersuchungen waren zumeist psychopathologische Zustände, die mit deutlichen Störungen des Membranpotentials in Verbindung gebracht wurden.

Die hohe oder niedrige Staubbadeaktivität der Wachtellinien N, K und H stellt jedoch keinen pathologischen Zustand dar, sondern eine mehr oder weniger starke Merkmalsausprägung innerhalb einer gewissen Varianz. Die Ergebnisse der Messungen sprechen dafür, dass die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  nicht der Grund für dieses veränderte Verhalten ist und umgekehrt die Selektion auf Staubbadeaktivität keine signifikanten Veränderungen in der Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  bewirkt.

Die Korrelationsanalyse ergab eine geringe, jedoch hochsignifikante Beziehung ( $P < 0,000$ ) zwischen den Messwerten des 7. und des 12. Bruttages. Die Tendenz zu hoher oder niedriger Atmungsaktivität der Wachtelembrionen steht also schon zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung fest. Diese Korrelation passt zu der Beobachtung, dass sich auch die Rangierung der Linien sowie die Überlegenheit der schlupffähigen Wachteln über die weniger vitalen Tiere bereits am 7. Bruttage abzeichnet.

Eine niedrige, aber hochsignifikante Korrelation wurde zwischen dem Sauerstoffverbrauch am 12. Bruttage und dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Lebergewebe mit dem



Substrat Succinat errechnet. Dies erscheint logisch, wenn man davon ausgeht, dass die embryonale Atmungsaktivität ein früher Indikator für die Stoffwechsellaage eines Organismus ist. Der höhere Sauerstoffbedarf von Wachtelembryonen der Linie H ist wahrscheinlich bereits auf eine intensivere mitochondriale Atmung zurückzuführen.

KESSLER (1998) fand bei Hühnern meist positive, jedoch nicht signifikante Korrelationen zwischen der embryonalen Atmungsrate am 13. Bruttag und der mitochondrialen Stoffwechselaktivität. Bei Puten war der embryonale Sauerstoffverbrauch nicht mit der mitochondrialen Atmungsrate, wohl aber mit dem RCR und dem ADP/O-Quotienten positiv verknüpft. Hieraus schließt die Autorin, dass eine hohe embryonale Atmungsaktivität mit einer effektiven oxidativen Phosphorylierung einhergeht (GRÖSCHL, 1998). Die embryonale und die mitochondriale Atmung bei Flugenten waren signifikant positiv miteinander korreliert (MEYER, 2002). Diese Beobachtungen an anderen Geflügelarten bestätigen überwiegend die Annahme, dass ein hoher embryonaler Sauerstoffbedarf zumindest anteilig durch eine hohe mitochondriale Atmungsaktivität zustande kommt.

Die hohe und hochsignifikante Korrelation zwischen den Atmungsraten der Lebermitochondrien mit den Substraten Succinat und Glutamat-Malat überrascht nicht, da es sich um vergleichbare Gewebeproben handelt. Diesen wurden zwei Substrate zur Verfügung gestellt, deren hauptsächlicher Unterschied in ihrer Eintrittsstelle in die Atmungskette besteht.

Aus den genannten Gründen waren die Ergebnisse für Pectoralismiotochondrien mit unterschiedlichen Substraten ebenfalls hoch bzw. hochsignifikant miteinander korreliert. Es konnte keine signifikante Korrelation der Atmungsraten von Leber und Brustmuskel miteinander nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  und der  $\text{Mg}^+\text{-ATPase}$  sind hochsignifikant miteinander korreliert, was ein Hinweis auf die funktionelle Abhängigkeit der beiden Enzyme sein könnte. Die enge Korrelation zwischen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ,  $\text{Mg}^+\text{-ATPase}$  und Gesamt-ATPase erklärt sich daraus, dass die letztere die Summe der beiden ersten darstellt. Es konnten keine signifikanten Beziehungen zwischen den ATPase-Aktivitäten und den verschiedenen Atmungsraten nachgewiesen werden.

Aus der vorliegenden Untersuchung ergeben sich deutliche Anhaltspunkte dafür, dass die Selektion des Verhaltensmerkmals Staubbadeaktivität korrelierte Effekte auf zellphysiologischer Ebene mit sich gebracht hat. Auch Untersuchungen anderer Autoren

haben gezeigt, dass die Selektion bestimmter Verhaltensmerkmale Auswirkungen auf unterschiedliche Stoffwechselbereiche hat. Die Mitochondrien als Organellen des Energiestoffwechsels spielen nach heutigem Kenntnisstand eine herausragende Rolle für die Leistungsfähigkeit, die Gesundheit und sogar das Altern und den Tod der Zellen. Wird ihre Funktionsfähigkeit beispielsweise durch Selektion herabgesetzt, kann dies logischerweise nicht ohne Folgen auf das Wohlbefinden sowie die Produktivität des Gesamtorganismus bleiben. Regelmäßige Kontrollen wichtiger physiologischer Parameter können dazu beitragen, möglichen negativen Konsequenzen einer solchen Selektion entgegenzusteuern.

Es ist abzusehen, dass sich der Schwerpunkt dieser züchterischen Überwachung in Zukunft immer mehr direkt auf Ebene der Genanalyse bewegen wird. Mit fortschreitender Kartographierung des Erbgutes der Haustiere und der Entwicklung von Markern können Korrelationen einzelner Merkmale leichter erklärt und möglicherweise beeinflusst werden. Die Frage, welche konkreten praktischen Vorteile sich aus der züchterischen Beeinflussung arttypischer Verhaltensweisen wie der Staubbadeaktivität ergeben, geht über den Rahmen der vorliegenden Untersuchung hinaus. Sicher soll nicht das Ziel sein, die Tiere durch genetische Anpassung so weit zu verändern, dass sie ohne Leistungseinbußen in einer nicht artgerechten Umgebung gehalten werden können.

Stattdessen verspricht die gezielte Selektion bestimmter Verhaltensparameter in Kombination mit artgerecht gestalteten Haltungsbedingungen die besten Fortschritte in Bezug auf das Wohlbefinden und die Produktivität landwirtschaftlicher Nutztiere.

## 6 Zusammenfassung

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, die Zusammenhänge zwischen Verhalten und Stoffwechselphysiologie näher zu beleuchten.

Als Versuchstiere dienten japanische Wachteln, die zuvor einer Zweiwegeselektion für das Merkmal Staubbadeaktivität unterworfen worden waren. Die auf diese Weise entstandenen Linien H (hohe Staubbadeaktivität), N (niedrige Staubbadeaktivität) und K (nicht selektierte Kontrolllinie) unterschieden sich in diesem Merkmal signifikant voneinander.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden stoffwechselphysiologische und biochemische Unterschiede der drei Linien untersucht, um etwas über die Konsequenzen der erfolgten Selektion und umgekehrt über die möglichen Ursachen für Varianz im Verhalten herauszufinden.

Im ersten Versuchsabschnitt wurde am siebten und am zwölften Bruttag der embryonale Sauerstoffverbrauch als Indikator der Stoffwechselaktivität gemessen. Die Linienzugehörigkeit beeinflusste die Ergebnisse hochsignifikant, wobei Embryonen der auf hohe Staubbadeaktivität selektierten Linie H stets Embryonen der Linien N und K in der Atmungsaktivität überlegen war. Vitale Embryonen hatten an beiden Messterminen einen signifikant höheren Sauerstoffverbrauch als Tiere, die nicht erfolgreich schlüpften. Diese Beobachtung wurde regelmäßig auch von anderen Autoren gemacht. Die Ergebnisse der Messungen legen nahe, dass die Selektion auf hohe Staubbadeaktivität bereits beim Wachtelembryo einen intensiveren Energiestoffwechsel und somit einen höheren Sauerstoffbedarf zur Folge hat.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde an isolierten Mitochondrien der Wachteln der Sauerstoffverbrauch während der oxidativen Phosphorylierung gemessen. Die Mitochondrien stammten aus der Leber bzw. aus dem *Musculus pectoralis profundus*. Als Substrate der Atmungskette dienten Succinat bzw. Glutamat-Malat, so dass vier unterschiedliche Versuchsanordnungen vorlagen. Mit den gemessenen Werten für die Atmungsaktivität wurden der Atmungskontrollindex RCR als Indikator für die Intaktheit der Mitochondrien und der ADP/O-Quotient als Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung berechnet.

In der Atmungsrate der Lebermitochondrien zeichnete sich eine signifikante Überlegenheit der Linie H ab. Der Einfluss der Linienzugehörigkeit auf die Messwerte war

hochsignifikant. Die Bestimmung der Atmungsrate von Mitochondrien des *M. pectoralis profundus* ergab keine einheitliche Rangierung der Linien.

Die Linienunterschiede für den Atmungskontrollindex RCR waren trotz der geringen Stichprobengröße tendenziell bis hochsignifikant. In allen vier Versuchsansätzen war ein Anstieg der RCR-Werte von der Linie N über K hin zu H zu verzeichnen.

Auch beim ADP/O-Quotienten zeigte sich die Linie H in drei von vier Versuchsansätzen den beiden anderen Linien überlegen.

Im dritten und letzten Versuchsabschnitt wurde an Gehirnproben der Wachteln die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase bestimmt. Dieses Enzym spielt eine entscheidende Rolle bei der Reizweiterleitung an Neuronen. Es konnten keine signifikanten Linienunterschiede in seiner Aktivität nachgewiesen werden, und der Faktor „Linie“ hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse. Dies spricht dafür, dass die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase nicht mitverantwortlich für Änderungen des Staubbadeverhaltens ist.

Zusammenfassend spricht einiges dafür, dass die Selektion von Wachteln auf hohe bzw. niedrige Staubbadeaktivität ihren Energiestoffwechsel signifikant beeinflusst hat. Hierbei geht höhere Staubbadeaktivität mit erhöhter Stoffwechselintensität einher. Die Linie H übertrifft die Linien N und K signifikant beim embryonalen Sauerstoffverbrauch, bei der Atmungsrate der Lebermitochondrien und bei der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung. Zusätzlich weisen in dieser Gruppe die mitochondrialen Membranen eine signifikant höhere Intaktheit als in den anderen Gruppen zu auf.

Generell kann die selektive Beeinflussung von Verhaltensmerkmalen zellphysiologische und sonstige Effekte mit sich bringen, die nicht immer erwünscht sind. Je früher solche Tendenzen erkannt werden, desto eher lassen sich züchterische Gegenmaßnahmen ergreifen.

Die Fortschritte auf dem Gebiet der Genanalyse erlauben gegenwärtig immer wieder neue Einblicke in die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Merkmalen, die zum besseren Verständnis der Effekte von Selektion führen können.

## 7 Summary

The purpose of the present thesis was to learn more about the relationship between behaviour and metabolic physiology.

The test animals were Japanese quail having undergone a bidirectional selection for dustbathing activity. The selection had resulted in the lines H (high dustbathing activity), N (low dustbathing activity) and K (not selected control line), who differed significantly in this behaviour trait. In the present study birds of the three quail lines were tested for physiological and biochemical differences to discover possible consequences of the carried-out selection and possible reasons for variance in behaviour.

In the first test phase the prenatal oxygen consumption as an indicator for metabolic activity was measured on the seventh and twelfth day of incubation. The factor “line” had a highly significant influence on the results. Embryos of the line H selected for high dustbathing activity constantly showed higher oxygen consumption than embryos of the lines N and K. On both test days embryos with good vitality had a significantly higher oxygen consumption than embryos that were not able to hatch successfully. This phenomenon has also been observed by other researchers. It seems likely that the selection for high dustbathing activity in the line H has resulted in an intensified energy metabolism and consequently a higher oxygen consumption.

In the second test phase the oxygen uptake of isolated mitochondria during the oxidative phosphorylation was examined. The mitochondria were taken from the liver and from the *Musculus pectoralis profundus* respectively. Succinate and Glutamate-Malate were provided as substrates for the respiratory chain, thus obtaining four test assemblies. From the obtained results for the respiratory activity, it was possible to calculate the respiratory control ratio RCR and the ADP/O-ratio, the first being an indicator for the mitochondrial integrity, the second showing the degree of efficiency of the oxidative phosphorylation.

The oxygen uptake of liver mitochondria of the line H significantly surpassed the two other groups. There was a highly significant influence of the factor “line” on these results. In the respiration activity of mitochondria from the *M. pectoralis profundus* no clear line ranking could be observed.

For the respiratory control ratio RCR there were tendentious line differences and highly significant line differences in spite of the relatively small number of samples. The four test

assemblies showed a correspondent line ranking with the lowest results for the line N, the highest results for the line H and intermediary results for the line K.

The line H also showed the highest results for the ADP/O-ratios in three out of four test assemblies.

In the third and last test phase the activity of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (or sodium pump) was examined in brain samples from the quail. This enzyme is essential for the signal transduction in neurons. There was no evidence for significant line differences in its activity, and the factor “line” did not have any significant influence on the obtained results. Therefor the sodium pump does not seem to be responsible for any variance in the dustbathing activity.

To sum up the results of the present study it is very likely that the selection of quail for high or low dustbathing activity respectively has had a significant influence on their energy metabolism. Higher dustbathing activity seems to be correlated to higher metabolic rates of the birds. The line H significantly surpassed the lines N and K in the embryonic oxygen uptake, in the respiration rate of liver mitochondria and in the efficiency of the oxidative phosphorylation in liver and muscle mitochondria samples. In addition the integrity of its mitochondrial membranes significantly excel the other groups.

The selection for behaviour traits can be responsible for cell physiological and further effects that are not always desirable. It is important to recognize these adverse effects as early as possible to take countermeasures.

The progressing analysis of many genomes presently leads to new insights into the connections of certain gene loci to each other and to a better understanding of the effects of selection.

## 8 Literaturverzeichnis

AIMAR-BEURTON, M.; KORZENIEWSKI, B.; LETELLIER, T.; LUDINARD, S.; MAZAT, J. P.; NAZARET, C. (2001):

Virtual mitochondria: Metabolic modelling and control.

Mol Biol Rep **29**(1-2): 227-232

AKAGAWA, K.; WATANABE, M.; TSUKADA, Y. (1980):

Activity of erythrocyte Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in manic patients.

J Neurochem **38**: 258-260

ALEXANDER, D. R.; DEEB, M.; BITAR, F.; ANTUN, F. (1986):

Sodium-potassium-, magnesium-, and calcium-ATPase activities in erythrocyte membranes from manic-depressive patients responding to lithium.

Biol Psychiatry **21**: 997-1007

ANDERSON S; BANKIER A. T.; BARRELL B. G.; DE BRUIJN, M. H.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J.; STADEN, R.; YOUNG, I. G. (1981):

Sequence and organization of the human mitochondrial genome.

Nature **290**: 457-465

ANDERSSON, S. G.; ZOMORODIPOUR, A.; ANDERSSON, J. O.; SICHERITZ-PONTEN, T.; ALSMARK, U. C.; PODOWSKI, R. M.; NASLUND, A. K.; ERIKSSON, A. S.; WINKLER, H. H.; KURLAND, C. G. (1998):

The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria.

Nature **396**: 133-40.

ANDREWS, R. M.; KUBACKA, I.; CHINNERY, P. F.; LIGHTOWLERS, R. N.; TURNBULL, D. M.; HOWELL, N. (1999):

Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.

Nat Genet **23**(2): 147

ANSLINGER, K.; ROLF, B. (2003):

Analyse der mtDNA zur Identifizierung von Knochen oder Leichenteilen.

Poster zu den Münchner Wissenschaftstagen „Fäden des Lebens – 30 Jahre Doppelhelix“

AR, A.; RAHN, H. (1985):

Pores in avian eggshells: Gas conductance, gas exchange and embryonic growth rate.

Respir Physiol **61**: 1-20

BALTHAZART, J.; BAILLIEN, M.; BALL, G. F. (2002):

Interactions between aromatase (estrogen synthase) and dopamine in the control of male sexual behavior in quail.

Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **132**: 37-55

BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. (2003):

Biochemie.

Spektrum akademischer Verlag

- BERNARDI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R.; PETRONILLI, V.; DI LISA, F. (1999):  
Mitochondria and cell death  
Mechanistic aspects and methodological issues.  
Eur J Biochem **264**: 687-701
- BESSEL, W.; JONES, R. B.; FAURE, J. M. (1983):  
Ease of capture by human beings of Japanese quail (c.c.j.) genetically selected for different  
activity levels.  
Arch Geflügelk **47**: 134-137
- BOBYLEVA-GUARRIERO, V.; HUGHES, P. E.; RONCHETTI-PASQUALI, I.; LARDY, H. A. (1984):  
The influence of fasting on chicken liver metabolites, enzymes and mitochondrial  
respiration.  
Comp Biochem Physiol **78 B(3)**: 627-632
- BOYER, P. D.; CROSS, R. L.; MOMSEN, W. (1973):  
A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular  
explanation of the oxygen exchange reactions.  
Proc Natl Acad Sci USA **90**: 2837-2839
- BOYER, P. D. (1989):  
A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis.  
FASEB J **3**: 2164-2178
- BRACKENBURY, J. H.; HOLLOWAY, S. A. (1991):  
Age and exercise effects on mitochondrial density and capillary fibre ratio in bird leg  
muscle.  
Br Poult Sci **32**: 645-653
- BRAND, M. D.; CHEN, C. H.; LEHNINGER, A. L. (1976):  
Stoichiometry of H<sup>+</sup> ejection during respiration-dependent accumulation of Ca<sup>2+</sup> by rat  
liver mitochondria.  
JBC **251**: 968-974
- BRANDON, M. C.; LOTT, M. T.; NGUYEN, K. C.; SPOLIM, S.; NAVATHE, S. B.; BALDI, P.;  
WALLACE, D. C. (2005):  
MITOMAP: A human mitochondrial genome database -2004 update.  
Nucleic Acids Res **33**: Database issue  
URL: <http://www.MITOMAP.org>
- BROWN, D. R.; DE NISE, S. K.; MC DANIEL, R. G. (1986):  
Hepatic mitochondrial activity in two breeds of chicken.  
Poult Sci **65**: 613-615
- CADE, J. F. J. (1949):  
Lithium salts in the treatment of psychotic excitement.  
Med J Aust **36**: 349-352



- CARMICHAEL, N. L.; JONES, R. B.; MILLS, A. D. (1998):  
Social preferences in Japanese quail chicks from lines selected for low or high social reinstatement motivation: effects of number and line identity of the stimulus birds.  
*Applied Animal Behaviour Science* **58**(3): 353-363(11)
- CAWTHON, D.; BEERS, K.; BOTTJE, W. G. (2001):  
Electron transport chain defect and inefficient respiration may underlie pulmonary hypertension syndrome(ascites)-associated mitochondrial dysfunction in broilers.  
*Poult Sci* **80**: 474-484
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. (1955):  
Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation.  
1. Kinetics of oxygen utilization.  
*J Biol Chem* **217**: 383-393
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. (1956):  
The respiratory chain and oxidative phosphorylation.  
*Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **17**: 65-134
- CIROTTI, C.; ARANGI, I. (1989):  
How do avian embryos breathe? Oxygen transport in the blood of early chick embryos.  
*Comp Biochem Physiol A* **94**(4): 607-613
- CORTASSA, S.; AON, M. A.; MARBAÑ, E.; WINSLOW, R. L.; O'ROURKE, B. (2003):  
An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics.  
*Biophys J* **84**: 2734-2755
- DECUYPÈRE, E.; MICHELS, H. (1992):  
Incubation temperature as a management tool: A review.  
*Poult Sci* **48**: 28-38
- DICK, D. A. T.; NAYLOR, G. J.; DICK, E. G. (1978)  
in:  
JOHNSON und JOHNSON (editors):  
*Lithium in Medical Practice*: 173-182
- DZAPO, V.; SCHNARR, W.; WASSMUTH, R. (1983):  
Mitochondrialer Stoffwechsel und heterotische Effekte beim Schwein  
Ergebnisse eines reziproken Kreuzungsversuchs  
I. Reproduktionsleistung, Wachstumsintensität und Schlachtkörperqualität.  
*Z Tierzucht Zuchtungsbiol* **100**: 109-122
- DZAPO, V.; REUTER, H.; WASSMUTH, R. (1973):  
Heterosis und mitochondriale Komplementation.  
*Z Tierzucht Zuchtungsbiol* **90**: 169-179
- DZAPO, V.; WASSMUTH, R. (1977):  
Atmungsaktivität und oxidative Phosphorylierung in den Muskelmitochondrien von Schweinen unterschiedlicher Vitalität.  
*Z Tierzucht Zuchtungsbiol* **94**: 76-83

DZAPO, V.; WASSMUTH, R. (1979 a):

Untersuchungen über die Enzymsysteme des energieliefernden Stoffwechsels im Rückenmuskel und die Konstitution des Schweines  
III.

Beziehungen der Vitalität und der Schlachtkörperzusammensetzung zu den Enzymmustern der Fettsäureoxydation, des Glykolyse-Seitenweges, der Atmungskette und der Mitochondrienmenge sowie zu der Systemrelation Citratzyklus/Glykolyse bzw. Atmungskette/Glykolyse.

Z Tierzucht Zuchtungsbiol **96**: 72-85

DZAPO, V.; WASSMUTH, R. (1979 B):

Vergleichende enzymatische Untersuchungen der energieliefernden Stoffwechselsysteme beim Schwein

4. Mitteilung: Zur Abhängigkeit der Vitalität und der Schlachtkörperzusammensetzung vom Enzymmuster der Fettsäureoxydation, des Glykolyse-Seitenweges, der Atmungskette sowie der Mitochondrienmenge im Herzgewebe bei Schweinen unterschiedlicher genetischer Herkunft.

Züchtungskunde **51**: 33-47

DZAPO, V.; WASSMUTH, R. (1982):

Mitochondriale Komplementation und reproduktive Kombinationseignung beim Schwein.

Z Tierzucht Zuchtungsbiol **99**: 123-138

DZAPO, V.; WASSMUTH, R. (1983):

Mitochondrialer Stoffwechsel und heterotische Effekte beim Schwein

Ergebnisse eines reziproken Kreuzungsversuchs

II. Atmungsaktivität und oxidative Phosphorylierung in Herz-, Leber- und Hodenmitochondrien.

Z Tierzucht Zuchtungsbiol **100**: 280-295

DZAPO, V.; WASSMUTH, R. (1984):

Mitochondrialer Stoffwechsel und heterotische Effekte beim Schwein

Ergebnisse eines reziproken Kreuzungsversuchs

III. Die Aktivitäten der Enzyme der Atmungskette in Leber-, Hoden- und Herzmitochondrien.

Z Tierzucht Zuchtungsbiol **101**: 112-130

EL-MALLAKH, R. S. (1983):

The Na, K-ATPase hypothesis for manic depression. General considerations.

Med Hypotheses **12**(3): 253-268

EMELYANOV, V. V. (2003):

Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell.

Eur J Biochem **270**: 1599-1618

ESTABROOK, R. W. (1967):

Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios.

Methods Enzymol **10**: 41-47

FARNER, D. S.; KING, J. R.; PARKES, K. C (1982):  
Respiration of the avian embryo.  
Avian Biology **VI**: 434-453

FAURE, J. M. (1981):  
Behavioural measures for selection.  
1st European Symposium of Poultry Welfare

FAURE, J. M. (1982):  
Analyse génétique du comportement en open-field du jeune poussin (*gallus gallus domesticus*).  
Ann.Génét. Sél. Anim., **14 (2)**, 187-212

FAURE, J. M. (1999):  
Present and future of the European legislation concerning poultry breeding.  
Proceedings of the International Congress on Bird Reproduction, Tours, September 1999

FAURE, J. M.; BESSEL, W.; JONES, R. B. (2003).  
Direct selection for improvement of animal well-being.  
In: MUIR, W.M.; AGGREY, S.E. (Hrsg.)  
Poultry Genetics, Breeding and Technology  
CAB International, Wellingford (GBR).

FAURE, J. M.; MILLS, A. D. (1995):  
Bien-être et comportement chez les oiseaux domestiques.  
Le Courrier de l'environnement de l'INRA n°26, décembre 1995  
INRA Productions animales **8(1)**: 57-67

FAURE, J. M.; MILLS, A. D. (1998):  
Improving the adaptability of animals by selection.  
In: GRANDIN, T. (Hrsg.)  
Genetics and the behaviour of domestic animals  
Academic Press

FAURE, J. M.; MILLS, A. D. (2000):  
La génétique du comportement.  
URL: [http://www.tours.inra.fr/tours/sra/publications/genetique\\_comp.htm](http://www.tours.inra.fr/tours/sra/publications/genetique_comp.htm)

FAURE, J. M.; MILLS, A. D.; LAUNAY, F.; FRANCOIS, N.; WILLIAMS, J.; GUÉMÉNÉ, D.; REMIGNON, H. (1996):  
Sélection pour le comportement: L'exemple de la caille.  
C R Acad Agric Fr **82 (2)**: 61-70

FRANCOIS, N., DECROS, S.; PICARD, M.; FAURE, J. M., MILLS, A. D. (2000):  
Effect of group disruption on social behaviour in lines of Japanese quail (*coturnix japonica*) selected for high or low levels of social reinstatement behaviour.  
Behav Processes **48**: 171-181

FRANCOIS, N.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M. (1998):

Place preferences of Japanese quail given a permanent choice between a social or a non-social but enriched situation.

Behav Processes **43**: 163-170

FRANCOIS, N.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M. (1999):

Inter-individual distances during open-field tests in Japanese quail (*coturnix coturnix japonica*) selected for high or low levels of social reinstatement behaviour.

Behav Processes **47**: 73-80

FRENCH, N. A. (1997):

Modelling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size.

Poult Sci **76**: 124-133

FRENCH, N. A. (2000):

Effect of short periods of high incubation temperature on hatchability and incidence of embryo pathology of turkey eggs.

Br Poult Sci **41**: 377-382

GARCIA-VALLVE, S. (2004):

Contribution of each complex of the mitochondrial respiratory chain in the generation of the proton-motive force.

Biochemistry and Molecular Biology Education **32(1)**: 17-19

GAUDINIÈRE, D.; CONSTANTIN, P.; RICHARD, S.; FAURE, J. M.; MILLS, A. D.; LETERRIER, C. (2002):

Behavioural and heart rate responses to an acoustic stimulus in quail.

4th world congress on stress, 2002, Edinburgh

GAULY, M. (1991):

Vergleichende Untersuchungen verschiedener Einflussfaktoren auf den Erfolg der Kunst- und Naturbrut des Fasans sowie zu Fragen der Aufzucht und Mast.

Dissertation agr., Justus-Liebig-Universität Gießen

GAULY, M.; DZAPO, V. (1992):

Untersuchungen zum Sauerstoffverbrauch von Fasanenembryonen während der Bebrütung mittels einer neuen Methode.

Arch Geflügelk **5**: 210-212

GAULY, M.; REINER, G.; GRÖSCHL, M.; DZAPO, V. (2001):

Auswirkungen variierender Brutbedingungen auf den embryonalen und mitochondrialen Energiestoffwechsel, den Thyroxinstatus sowie die Lebendmasseentwicklung bei Puten.

Arch Geflügelk **65(1)**: 1-9

GERKEN, M. (1983):

Untersuchungen zur genetischen Fundierung und Beeinflussbarkeit von Verhaltensmerkmalen des Geflügels, durchgeführt in einem Selektionsexperiment auf Staubbadeverhalten bei der japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*).

Dissertation agr., Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn

- GERKEN, M. (1991):  
Antagonistische Beziehungen zwischen Verhaltens- und Leistungsmerkmalen beim Geflügel.  
Habilitationsschrift, Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn,
- GERKEN, M.; BAMBERG, H.; PETERSEN, J. (1988):  
Studies of the relationship between fear-related responses and production traits in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) bidirectionally selected for dustbathing activity.  
Poult Sci **67**: 1363-1371
- GERKEN, M.; PETERSEN, J. (1985):  
Der Einfluß von Geschlecht und Genotyp auf das Staubbadeverhalten von japanischen Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*).  
Arch Geflügelk **49**: 237-246
- GERKEN, M.; PETERSEN, J. (1987):  
Bidirectional Selection for dustbathing activity in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).  
Br Poult Sci **28**: 23-37
- GLEN A. I. M. (1978): 183-192  
In: JOHNSON und JOHNSON (Hrsg.)  
Lithium in Medical Practice
- GRÖSCHL, M. (1998):  
Untersuchungen zur Auswirkung variierender Brutbedingungen auf den embryonalen und mitochondrialen Energiestoffwechsel sowie auf die histometrischen Merkmale und die Lebendmasseentwicklung bei Puten.  
Dissertation vet. med., Justus-Liebig-Universität Gießen
- GUÉMENE, D.; FAURE, J. M. (2004):  
Productions avicoles, bien-être et législation européenne.  
INRA Prod Anim **17(1)**: 59-68
- GUERRA, G.; MARTÍNEZ, F.; PARDO, J. P. (2002):  
On the  $H^+/2e^-$  stoichiometry of the respiratory chain.  
BAMBED **30(6)**: 363–367
- HILLER, P. (1994):  
Untersuchungen über den embryonalen und mitochondrialen Energiestoffwechsel beim Legehuhn im Hinblick auf die Zuchtwertschätzung der Reproduktionsleistung.  
Dissertation agr., Justus-Liebig-Universität Gießen
- HINKLE, P. C. (2005):  
P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation.  
Biochim Biophys Acta **1706(1-2)**: 1-11
- HINKLE, P. C.; KUMAR, M. A.; RESETAR, A.; HARRIS, D. L. (1991):  
Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation.  
Biochemistry **30(14)**: 3576-3582

- HOGG, S.; MILLS, A. D.; FILE, S. E. (1996):  
Differences in benzodiazepine binding in quail selectively bred for differences in tonic immobility.  
*Pharmacol Biochem Behav* **54**(1): 117-121
- HOKIN-NEAVERSON, M.; BARCKHARDT, W. A.; JEFFERSON, J. W. (1976):  
Increased erythrocyte Na<sup>+</sup>-pump and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity during lithium therapy.  
*Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **14**: 117-126
- HOKIN-NEAVERSON, M.; SPIEGEL, D. A.; LEWIS, W. C. (1974):  
Deficiency of erythrocyte pump activity in bipolar manic-depressive psychosis.  
*Life Science* **15**: 1739-1748
- HOYT, D. F (1987):  
A new model of avian embryonic metabolism.  
*J Exp Zool Suppl* **1**: 127-138
- HOYT, D. F.; RAHN, H. (1980):  
Respiration of avian embryos –A comparative analysis.  
*Respir Physiol* **39**(3): 255-264
- HWANG-BO, J.; MURAMATSU, T.; OKUMURA, J. (1990):  
Research note: Relative biopotency of triiodothyronine and of thyroxine for inducing oxygen consumption in young chicks.  
*Poult Sci* **69**: 1027-1029
- JACOBUS, W. E.; MOREADITH, R. W.; VANDEGAER, K. M.(1982):  
Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios.  
*J Biol Chem.* **257**(5): 2397-2402.
- JANKE, O.; TZSCHENTKE, B.; HOCHER, J.; NICHELMANN, M (2002):  
Metabolic responses of chicken and muscovy duck embryos to high incubation temperatures.  
*Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **131**(4): 741-750
- JONES, R. B.; FAURE, J. M. (1981):  
Sex and strain comparisons of tonic immobility („righting time“) in the domestic fowl and the effects of various methods of induction.  
*Behav Processes* **6**: 47-55
- JONES, R. B.; HOCKING, P. (1999):  
Genetic selection for poultry behaviour: Big bad wolf or friend in need?  
*J Appl Anim Welf Sci* **8**(4): 343-359
- JONES, R. B.; MARIN, R. H.; SATTERLEE, D. G. (2004):  
A 'pebble test of anxiety' did not differentiate between Japanese quail divergently selected for stress and fear.  
*Applied Animal Behaviour Science* **87**(3-4): 285-291

- JONES, R. B.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M. (1991):  
Genetic and experiential manipulation of fear-related behavior in Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*).  
J Comp Psychol **105**(1): 15-24
- JONES, R. B.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M. (1996):  
Social discrimination in Japanese quail (*Coturnix japonica*) chicks genetically selected for low or high social reinstatement motivation.  
Behav Processes **36**: 117-124
- JONES, R. B.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M.; WILLIAMS, J. B. (1994):  
Restraint, fear, and distress in Japanese quail genetically selected for long or short tonic immobility reactions.  
Physiol Behav **56**(3): 529-534
- JONES, R. B.; SATTERLEE, D. G.; CADD, G. G. (1999):  
Timidity in Japanese quail: Effects of vitamin C and divergent selection for adrenocortical response.  
Physiol Behav **67**(1): 117-120
- JONES, R. B.; SATTERLEE, D. G.; MARKS, H. L. (1997):  
Fear-related behaviour in Japanese quail divergently selected for body weight.  
Applied Animal Behaviour Science **52**(1): 87-98
- JONES, R. B.; SATTERLEE, D. G.; WADDINGTON, D.; CADD, G. G. (2000):  
Effects of repeated restraint in Japanese quail genetically selected for contrasting adrenocortical responses.  
Physiol Behav **69**(3): 317-324
- KEILIN, D. (1925):  
On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants.  
Proc R Soc Lond B Biol Sci **98**: 312-339
- KESSLER, P. (1998):  
Untersuchungen über die Auswirkungen unterschiedlicher Bruttemperaturen auf den embryonalen und mitochondrialen Energiestoffwechsel im Hinblick auf Wachstum, Legeleistung und Selektion beim Huhn.  
Dissertation vet. med., Justus-Liebig-Universität Gießen
- LAUNAY, F.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M. (1991):  
Social motivation in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) chicks selected for high or low levels of treadmill behaviour.  
Behav Processes **24**: 95-110
- LAUNAY, F.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M. (1993 A):  
Effects of test age, line and sex on tonic immobility responses and social reinstatement behaviour in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).  
Behav Processes **29**: 1-16

- LAUNAY, F.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M.; WILLIAMS (1993 B):  
Effects of CRF on isolated Japanese quails selected for fearfulness and for sociality.  
*Physiol Behav* **55**: 111-118
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (2001):  
Lehninger Biochemie.  
Verlag Springer
- LEON-VELARDE, F.; MONGE, C. C. (2004):  
Avian embryos in hypoxic environments.  
*Respir Physiol Neurobiol* **141(3)**: 331-343
- LINNOILA, M.; MAC DONALD, E.; REIMILA, M. ; LEROY, A. ; RUBINOW, D. R. ; GOODWIN, F. K. (1983):  
RBC membrane adenosine triphosphatase activity in patients with major affective disorders.  
*Arch Gen Psychiatry* **40**: 1021-1026
- MAGGS, R. (1963):  
Treatment of manic illness with lithium carbonate.  
*Br J Psychiatry* **109**: 56-65
- MARIN, R. H.; SATTERLEE, D. G.; CADD, G. G.; JONES, R. B. (2002):  
T-maze behavior and early egg production in Japanese quail selected for contrasting adrenocortical responsiveness.  
*Poult Sci* **81(7)**: 981-986
- MARIN, R. H.; SATTERLEE, D. G.; CASTILLE, S. A.; JONES, R. B. (2003):  
Early T-maze behavior and broiler growth.  
*Poult Sci* **82(5)**: 742-748
- MERSMANN, H. J.; GOODMAN, J.; HOUK, J. M.; ANDERSON, S.(1972):  
Studies on the biochemistry of mitochondria and cell morphology in the neonatal swine hepatocyte.  
*J Cell Biol* **53**: 335-347
- MEYER, H. (2002):  
Untersuchungen zu dem Einfluss verschiedener Brutbedingungen auf die embryonale und mitochondriale Stoffwechselaktivität unter besonderer Berücksichtigung der Gewichtsentwicklung, der Ausprägung histometrischer Parameter und der Fleischbeschaffenheit bei Flügeln.  
Dissertation agr., Justus-Liebig-Universität Gießen
- MIGNON-GRASTEAU, S; FAURE, J. M. (2002):  
Génétique et adaptation : Le point des connaissances chez les volailles.  
*INRA Prod Anim* **15(5)**: 357-364



- MIGNON-GRASTEAU, S.; MINVIELLE, F (2003):  
Relation between tonic immobility and production estimated by factorial correspondence analysis in Japanese quail.  
Poult Sci **82(12)**: 1839-1844
- MILLS, A. D.; CRAWFORD, L. L.; DOMJAN, M.; FAURE, J. M. (1997):  
The behavior of the Japanese or Domestic quail.  
Neurosci Biobehav Rev **21(3)**: 261-281
- MILLS, A. D.; FAURE, J. M. (1991):  
Divergent selection for duration of tonic immobility and social reinstatement behavior in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) chicks.  
J Comp Psychol **105(1)**: 25-38
- MILLS, A. D.; FAURE, J. M. (2000):  
Ease of capture in lines of Japanese quail (*Coturnix japonica*) subjected to contrasting selection for fear or sociability.  
Appl Anim Behav Sci **69(2)**: 125-134
- MILLS, A. D.; FAURE, J. M.; LAGADIC, H (1988):  
Génétique du stress.  
Réc Méd Vét **164(10)**: 793-800
- MILLS, A. D.; JONES, R. B.; FAURE, J. M. (1995):  
Species specificity of social reinstatement in Japanese quail (*Coturnix japonica*) genetically selected for high or low levels of social reinstatement behaviour.  
Behav Processes **34**: 13-22
- MILLS, A. D.; JONES, R. B.; FAURE, J. M.; WILLIAMS, J. B. (1995):  
Responses to isolation in Japanese quail genetically selected for high or low sociality.  
Physiol Behav **53**: 183-189
- MINVIELLE, F. (2004):  
The future of Japanese Quail for research and production.  
Worlds Poult Sci J **60(4)**: 500-507
- MINVIELLE, F.; MILLS, A. D.; FAURE, J. M.; MONVOISIN, J. L.; GOURICHON, D. (2002):  
Fearfulness and performance related traits in selected lines of Japanese quail (*Coturnix japonica*).  
Poult Sci **81(3)**: 321-326
- MITCHELL, P. (1961):  
Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.  
Nature **191**: 144-148
- MITCHELL, P. (1978):  
David Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences.  
Science **206**: 1148-1159

- NAIR, G.; BAGGOTT, G. K.; DAWES, C. M. (1982):  
Gas tensions within the egg of the quail (*Coturnix coturnix japonica*) during the closing stages of embryonic development.  
Com Biochem Physiol **71A**: 313-316
- NAITO, M.; PERRY, M. M. (1989):  
Development in culture of the chick embryo from cleavage to hatch.  
Br Poult Sci **30**: 251-256
- NAYLOR, G. J.; DICK, D. A. T.; DICK, E. G.; MOODY, J. P. (1974):  
Lithium therapy and erythrocyte membrane cation carrier.  
Psychopharmacologia **37**: 81-86
- OAKNIN, S.; DEL CASTILLO, A. R.; GUERRA, M. ; BATTANER, E., MAS, M. (1989):  
Changes in forebrain Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and serum hormone levels during sexual behaviour in male rats.  
Physiol Behav **45**: 407-410
- ODEH, F. M.; CADD, G. G.; SATTERLEE, D. G. (2003 A):  
Genetic characterization of stress responsiveness in Japanese quail.  
1. Analyses of line effects and combining abilities by diallel crosses.  
Poult Sci **82(1)**: 25-30
- ODEH, F. M.; CADD, G. G.; SATTERLEE, D. G. (2003 B):  
Genetic characterization of stress responsiveness in Japanese quail.  
2. Analyses of maternal effects, additive sex linkage effects, heterosis, and heritability by diallel crosses.  
Poult Sci **82(1)**: 31-35
- PAGANELLI, C. V. (1980):  
The physics of gas exchange across the avian eggshell.  
Amer Zool **20**: 329-338
- PAGANELLI, C. V.; SOTHERLAND, P. R.; OLSZOWKA, A. J.; RAHN, H. (1988):  
Regional differences in diffusive conductance/perfusion ratio in the shell of the hen's egg.  
Respir Physiol **71(1)**: 45-55
- PEH, J. (1969):  
Haltung und Fütterung der Japanischen Wachtel und Untersuchungen zum Nährstoffbedarf sowie Bibliographie zu *Coturnix japonica* (1958-1966).  
Dissertation vet. med., Ludwig-Maximilian-Universität München
- POWERS, S. K.; CRISWELL, D.; LIEU, F.; DODD, S.; SILVERMAN, H. (1992):  
Exercise-induced cellular alterations in the diaphragm.  
Am J Physiol **263**: 1093-1098
- RACKER, E. (1980):  
From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics.  
Fed Proc **39(2)**: 210-215.

- RAHN, H.; AR, A. (1980):  
Gas exchange of the avian egg: Time, structure and function.  
*Amer Zool* **20**: 477-484
- RAPPORT, R. L. II; HARRIS, A. B.; FRIEL, P. N.; (1975):  
Human epileptic brain:  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase activity and phenytoin concentrations.  
*Arch Neurol* **32**: 549-554
- REDDY, P. L.; KHANNA, S.; SUBHASH, M. N.; CHANNABASAVANNA, S. M.; RAO, B. S. S. R. (1989):  
Erythrocyte membrane  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase activity in affective disorder.  
*Biol Psychiatry* **26**: 533-537
- REINER, G.; DZAPO, V. (1995):  
Der Sauerstoffverbrauch von Straußenembryonen während der Brut.  
*Dtsch Tierärztl Wschr* **102(2)**: 93-96
- REMIGNON, H.; MILLS, A. D.; GUÉMENE, D.; DESROSIERS, V.; GARREAU-MILLS, M.; MARCHE, M.; MARCHE, G. (1998):  
Meat quality traits and muscle characteristics in high or low fear lines of Japanese quails (*Coturnix japonica*) subjected to acute stress.  
*Br Poult Sci* **39(3)**: 372-378
- RICHARD, S.; DAVIES, D. C.; FAURE, J., M. (2000):  
The role of fear in one-trial passive avoidance learning in Japanese quail chicks genetically selected for long or short duration of the tonic immobility reaction.  
*Behav Processes* **48(3)**: 165-170
- ROUSSEL, D.; ROUANET, J.-L.; DUCHAMP, C.; BARRE, H. (1998):  
Effects of cold acclimation and palmitate on energy coupling in duckling skeletal muscle mitochondria.  
*FEBS Letters* **439**: 258-262
- ROUSSOT, O.; PITEL, F.; VIGNAL, A.; FAURE, J. M.; MILLS, A. D.; GUÉMENE, D.; LETERRIER, C.; MIGNON-GRASTEAU, S.; LE ROY, P.; BEAUMONT, C. (2001):  
Recherche des zones du génome contrôlant l'émotivité chez la caille.  
Quatrième journées de la recherche avicole, Nantes, 27-29 mars 2001
- ROUSSOT, O.; PITEL, F.; VIGNAL, A.; FAURE, J. M.; MILLS, A. D.; GUÉMENE, D.; LETERRIER, C.; MIGNON-GRASTEAU, S.; LE ROY, P.; BEAUMONT, C. (2002):  
QTL-research on duration of tonic immobility in quail.  
7th world congress on genetics applied to livestock production, August 19-23, 2002, Montpellier, France
- SARASTE, M. (1999):  
Oxidative phosphorylation at the fin de siècle.  
*Science* **283**: 1488-1493

SATTERLEE, D. G.; JONES, R. B. (1997):

Ease of capture in Japanese quail of two lines divergently selected for adrenocortical response to immobilization.

Poult Sci **76**(3): 469-471

SATTERLEE, D.G.; JOHNSON, W. A. (1988):

Selection of Japanese quail for contrasting blood corticosterone response to immobilization.

Poult Sci **67**: 25-32.

SATTERLEE et al., 2002

SATTERLEE, D. G.; MARIN, R. H.; JONES, R. B. (2002):

Selection of Japanese quail for reduced adrenocortical responsiveness accelerates puberty in males.

Poult Sci **81**(7): 1071-1076

SCHARSCHMIDT, B. F.; KEEFFE, E. B.; BLANKENSHIP, N. M.; OCKNER, R. K. (1979):

Validation of a recording spectrophotometric method for measurement of membrane-associated Mg- and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity.

J Lab Clin Med **93**(5): 790-799

SCHEINER-BOBIS, G. (2002):

The sodium pump: Its molecular properties and mechanics of ion transport.

Eur J Biochem **269**: 2424–2433

SCHOLTYSSEK PROF. DR. S.; DOLL, P. (1978):

Nutz- und Ziergeflügel.

Verlag Ulmer

SCHONER, W. (2002):

Sodium pump and steroid hormone receptor: Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase.

Eur J Biochem **269**: 2423

SCHNORR, B.; KRESSIN, M. (2001):

Embryologie der Haustiere.

Verlag Enke

SCHOU, M. (1968):

Lithium in psychiatric therapy and prophylaxis.

J Psychiatr Res **6**: 67-95

SENGUPTA, N.; DATTA, S. C.; SENGUPTA, D.; BAL, S. (1980):

Platelet and erythrocyte-membrane adenosine triphosphatase activity in depressive and manic-depressive illness.

Psychiatry Res **3**: 337-344

SKOU, J.C. (1989):

The identification of the sodium-pump as the membrane-bound  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ :  
*Biochim Biophys Acta* **1000**: 435-438

a commentary on

SKOU, J.C. (1957):

The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.  
*Biochim Biophys Acta* **23**: 394-401

SLATER, E. C. (2003):

Keilin, Cytochrome, and the respiratory chain.

*J Biol Chem* **278(19)**: 16455–16461

SOMMER, M. (1986):

Mitochondrialer Energiestoffwechsel als zellphysiologischer Indikator der Heterosis in Leistungsmerkmalen bei Huhn.

Dissertation agr., Justus-Liebig-Universität Gießen

STEPHAN, E. (1993):

Untersuchungen zum Wachstum beim Huhn unter besonderer Berücksichtigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation und des Energiestoffwechsels myokardialer Mitochondrien sowie histometrischer Parameter.

Dissertation agr., Justus-Liebig-Universität Gießen

SUAREZ, M. E.; WILSON, H. R.; MC PHERSON, B. N.; MATHER, F. B.; WILCOX, C. J. (1996):

Low temperature effects on embryonic development and hatch time.

*Poult Sci* **75**: 924-932

TAZAWA, H.; HASHIMOTO, Y.; NAKAZAWA, S.; WHITTOW, G. C. (1992):

Metabolic responses of chicken embryos and hatchlings to altered  $\text{O}_2$ -environments.

*Respir Physiol* **88**: 37-50

TULLETT, S. G.; DEEMING, D. C. (1982):

The relationship between eggshell porosity and oxygen consumption of the embryo in the domestic fowl.

*Comp Biochem Physiol* **72A(3)**: 529-533

TURRO-VINCENT, I.; LAUNAY, F.; MILLS, A. D.; PICARD, M.; FAURE, J. M. (1995):

Experiential and genetic influences on learnt food aversions in Japanese quail selected for high or low levels of fearfulness.

*Behav Processes* **34(1)**: 23-41

VINCE, M. A.; TOLHURST, B. E. (1975):

The establishment of lung ventilation in the avian embryo: The rate at which lungs become aerated.

*Comp Biochem Physiol* **52A**: 331-337

VISSCHEDIJK, A. H. J.; GIRARD, H.; AR, A. (1988):

Gas diffusion in the shell membranes of the hen's egg: Lateral diffusion in situ.

*J Comp Physiol B* **158**: 567-574

VISSCHEDIJK, A. H. J.; TAZAWA, H.; PIIPER, J. (1985):

Variability of shell conductance and gas exchange of chicken eggs.  
Respir Physiol **59(3)**: 339-345

VLECK, C. M.; VLECK, D. (1980):  
Patterns of metabolism and growth in avian embryos.  
Amer Zool **20**: 405-416

VLECK, C. M.; VLECK, D. (1987):  
Metabolism and energetics of avian embryos.  
J Exp Zool Suppl **1**: 111-125

WANGENSTEEN, O. D.; RAHN, H. (1970/71):  
Respiratory gas exchange by the avian embryo.  
Respir Physiol **11**: 31-45

WILSON, H. R. (1997):  
Effects of maternal nutrition on hatchability.  
Poult Sci **76(1)**: 134-143

YANG, N.; DUNNINGTON, E. A.; SIEGEL, P. B. (1998):  
Forty generations of bidirectional selection for mating frequency in male Japanese quail.  
Poult Sci **77(10)**: 1469-1477

ZILE, M. H. (2004):  
Vitamin A requirement for early cardiovascular morphogenesis specification in the vertebrate embryo: Insights from the avian embryo.  
Exp Biol Med **229(7)**: 598-606

ZIMMER-RÜHLE, S.; GERKEN, M.; PETERSEN, J. (1992):  
Kreuzungseffekte bei verschiedenen Verhaltensmerkmalen japanischer Wachteln.  
Arch Geflügelk **56(3)**: 117-123

ZUCKER, H.; GROPP, J.; PEH J.; ZENTZ C. (1967):  
Erfahrungen mit der japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) als Labortier sowie einige Ergebnisse von Nährstoffbedarfsuntersuchungen.  
Tierärztl Umsch **22**: 416-423

### **Danksagung:**

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. V. Dzapo für die Überlassung des Themas, die Übernahme der Betreuung, die wertvollen Anregungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. P. Engel für die gewährte Unterstützung bei der Planung und Fertigstellung dieser Arbeit, für die zahlreichen konstruktiven Gespräche und Korrekturen sowie für ihren Optimismus.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Brandt vom Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen für seine geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Bei Frau Prof. Dr. M. Gerken (Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen) und Herrn Prof. i.R. Dr. J. Petersen (Institut für Tierzuchtwissenschaften der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) bedanke ich mich für die freundliche Überlassung von Bruteiern der Wachtellinien N, K und H.

Herrn L. Graff sei gedankt für die geleisteten Vorarbeiten, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dzapo und der Lehr- und Forschungsstation „Oberer Hardthof“ der Justus-Liebig-Universität Gießen für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Möglichkeit der Nutzung von Räumlichkeiten und Einrichtungen.

Zuletzt, aber ganz besonders, möchte ich mich bei meinen Eltern und bei allen Freunden und Familienangehörigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und für mich da waren.

Danke!

## **ERKLÄRUNG:**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



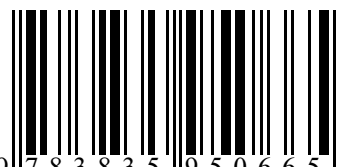


édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5066-5



9 783835 950665